

**Amylase MalS und Protease DegP aus *Escherichia coli*:
Faltung und Abbau unter Kontrolle der Temperatur**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)
an der Fakultät für Biologie
der Universität Konstanz

von
Christoph Spiess

Konstanz
1999

Dissertation der Univeristät Konstanz
Tag der mündlichen Prüfung: 29.11.1999

Referent: Prof. Dr. W. Boos

Referent: Prof. Dr. M. Ehrmann

Der experimentelle Teil dieser Arbeit wurde am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Konstanz durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Priv. Doz. Dr. Michael Ehrmann dafür, daß er mir diese Arbeit zur selbständigen Bearbeitung überlassen hat. Sein ständiges Engagement, seine Unterstützung und seine Diskussionsfreude haben diese Arbeit immer gefördert und zahlreiche wissenschaftlichen Kooperationen erst ermöglicht.

Außerdem gilt mein Dank Prof. Dr. Winfried Boos für die freundliche Aufnahme an seinen Lehrstuhl, für seine Gesprächsbereitschaft und die Begutachtung dieser Arbeit.

Den Drs. Fredrik Åslund, Jim Bardwell, Paul Danese, Ann Flower, Luzma Guzman, Joe Pogliano und Bob Sauer sei für die großzügige Bereitstellung ihrer Stämme und Plasmide und Jean-Michel Betton für die technischen Ratschläge gedankt!

Ein herzliches Dankeschön für die angenehme Arbeitsatmosphäre allen Booslingen. Mein besonderer Dank gilt dabei Alexandra Beil; die Zusammenarbeit mit ihr hat mir viel Spaß gemacht. Auch Inka Welte, die im Rahmen ihres Vertiefungskurses mitgearbeitet hat, möchte ich hier nicht vergessen. Renate Riek danke ich für die Aufnahme des Fluoreszenzspektrums von DegP. Die Diskussionen mit Kerstin Uhland haben so manches Problem aufgeworfen, aber auch gelöst. Günter Kramer danke ich für die Überlassung der Formatierungsvorlage, die mir viel Arbeit erspart hat.

Dank möchte ich auch Prof. Dr. Baumeister, Priv. Doz. Dr. Michael O. Glocker, H. Peter Happersberger, Günter Pfeifer, Dr. Karsten Rippe, Prof. Dr. Eberhard Spiess und Kornelius Zeth für die freundliche und informative Zusammenarbeit aussprechen.

Die tatkräftige technische Unterstützung von Inga Mettke hat mir die Arbeit erleichtert. Aber auch ihre Geduld und Opfer, die während dieser Dissertation notwendig waren, habe ich nicht vergessen. Dankeschön!

Für die Durchsicht des Manuskriptes und seinem ständigen Interesse für meine Arbeit möchte ich mich bei meinem Vater bedanken.

Schließlich danke ich der Studienstiftung des deutschen Volkes, die mir ein Promotionsstipendium gewährte und auch die Präsentation meiner Ergebnisse auf Tagungen förderte.

Teile dieser Arbeit sind in folgenden Veröffentlichungen enthalten:

Spiess, C., Happersberger, H. P., Glocker, M. O., Spiess, E., Rippe, K., Ehrmann, M. (1997). Biochemical characterization and mass spectrometric disulfide bond mapping of periplasmic α -amylase MalS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 22125-22133.

Spiess, C., Beil, A., Ehrmann, M. (1999). A temperature dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347.

1. ZUSAMMENFASSUNG	1
2. EINLEITUNG	3
2.1 Das Maltosesystem von <i>Escherichia coli</i>	3
2.1.1 Dextrinspaltende Enzyme des Maltosesystems	3
2.1.2 Die α -Amylase MalS	4
2.1.2.1 Homologie von MalS zu anderen Amylasen	4
2.1.2.2 Tertiärstruktur von Amylasen	5
2.2 Die Proteinfaltung im Cytoplasma von <i>Escherichia coli</i>	5
2.2.1 Die Faltungshelfer im Cytoplasma	5
2.2.2 Das Redoxpotential im Cytoplasma	6
2.3 Die Proteinfaltung im Periplasma von <i>Escherichia coli</i>	7
2.3.1 Die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran	7
2.3.2 Faltungskatalysatoren im Periplasma	8
2.3.3 Chaperone im Periplasma	9
2.4 Das Schicksal falsch gefalteter Proteine	10
2.5 Die periplasmatische Protease DegP	10
2.5.1 Die Struktur von DegP	11
2.5.2 Die Regulation der <i>degP</i> -Expression in der Zelle	12
2.5.3 DegP Homologe	14
2.5.4 DegP als Werkzeug in der Biotechnologie und Pharmazie	14
2.6 Aufgabenstellung	15
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 Abkürzungen	17
3.2 Bezugsquellen der Chemikalien und Dienstleistungen	18
3.3 Bakterienstämme und Plasmide	19
3.4 Antiseren und Antikörper	21
3.5 Medien	22
3.5.1 Flüssigmedien und Nährböden	22
3.5.2 Medienzusätze	23
3.6 Mikrobiologische Methoden	23
3.6.1 Sterilisation	23
3.6.2 Aufbewahrung von Stämmen	23
3.6.3 Wachstumsbedingungen	24
3.6.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen	24

3.6.5 Arbeiten mit dem Bakteriophagen P1	24
3.6.5.1 Herstellung eines P1-Lysates	24
3.6.5.2 P1-Transduktion	24
3.6.6 Konstruktion von Bakterienstämmen	24
3.7 Molekularbiologische Methoden	25
3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA	25
3.7.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA	25
3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	26
3.7.4 Ligierung von DNA-Fragmenten	27
3.7.5 Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen	28
3.7.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen	28
3.7.7 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation	28
3.7.7.1 TSS-Transformation	28
3.7.7.2 Elektrotransformation	29
3.7.8 Plasmidkonstruktionen	29
3.7.8.1 Konstruktion von pCS10	29
3.7.8.2 Konstruktion von pCS13	29
3.7.8.3 Konstruktion von pCS19	29
3.7.8.4 Konstruktion von pCS20	30
3.7.8.5 Konstruktion von pCS21	31
3.7.8.6 Konstruktion von pCS24	31
3.7.8.7 Konstruktion von pCS26	31
3.7.8.8 Konstruktion von pIC1	31
3.7.8.9 Konstruktion von pIW4	32
3.7.8.10 Konstruktion von pIW5	32
3.7.8.11 Konstruktion von pIW6	32
3.7.8.12 Konstruktion von pIW7	33
3.7.8.13 Konstruktion von pIW9	33
3.7.8.14 Konstruktion von pIW10	33
3.7.8.15 Konstruktion von pIW11	33
3.7.8.16 Konstruktion von pIW12	33
3.8 Biochemische Methoden	33
3.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	33
3.8.2 Färben von SDS-Gelen	34
3.8.2.1 Coomassie-Färbung nach Fairbanks	34
3.8.2.2 Coomassie-Färbung nach Neuhoff	34
3.8.2 Western Immunoblotanalyse	35
3.8.3 Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten	36
3.8.3.1 Citrat Synthase	36
3.8.3.2 β -Galaktosidase-Aktivität in Ganzzellen	37
3.8.3.3 Aktivität von reiner β -Galaktosidase	38
3.8.3.4 MalS-Aktivität in Zellen	39
3.8.3.5 Enzymatische Aktivität von gereinigtem MalS	40

3.8.3.6	Enzymatische Aktivität von gereinigtem DegP und DegP-Derivaten durch Resorufin-markiertes Casein	40
3.8.3.7	Spaltung von kurzkettigen pNA-Peptiden durch DegP	41
3.8.3.8	Spaltung von langkettigen Peptiden durch DegP	42
3.8.4	Proteinreinigung	43
3.8.4.1	Reinigung von MalS	43
3.8.4.2	Reinigung von Δ ssMalS	44
3.8.4.3	Reinigung der Proteine DegP, DegP _{S210A} , DegP Δ PDZ1, DegP Δ PDZ2 und PDZ ₁₊₂	45
3.8.4.4	Reinigung von DegP Δ PDZ1,2	46
3.8.5	Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten mittels Gelfiltration	46
3.8.6	Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen durch UV-Absorption	47
3.8.7	Denaturierung und Rückfaltung der Proteine Δ ssMalS, Citrat Synthase und β -Galaktosidase	48
3.8.7.1	Δ ssMalS	48
3.8.7.2	Citrat Synthase	49
3.8.7.3	β -Galaktosidase	50
3.8.8	Pulse-Chase-Experimente zur radioaktiven Markierung von zellulären Proteinen und Immunpräzipitation	50
3.9.	Elektronenmikroskopie von gereinigten Proteinen	50
3.9.1	MalS	52
3.9.2	Negativkontrastierung von DegP _{S210A}	53
3.10	Computeranalysen und Homologieuntersuchungen von DNA- und Aminosäuresequenzen und Bildverarbeitung mit Hilfe von Computerprogrammen	53
4.	ERGEBNISSE	54
4.1	Reinigung und biochemische Charakterisierung von MalS	54
4.1.1	Reinigung von MalS	54
4.1.2	Biochemische Charakterisierung von MalS	55
4.1.2.1	Die enzymatische Aktivität von MalS ist abhängig von bivalenten Kationen	55
4.1.2.2	MalS hat das Kation Ca ²⁺ gebunden	55
4.1.2.3	MalS hat ein pH-Optimum im alkalischen Bereich	56
4.1.2.4	Mit steigender Osmolarität nimmt die Aktivität von MalS ab	57
4.1.2.5	Die K_M von MalS beträgt 49 μ M und die v_{max} 0,36 μ mol/min	57
4.1.2.6	Die Reduktion der Disulfidbrücken im nativen Protein hat keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von MalS	59
4.1.2.7	Die Reduktion der Disulfidbrücken führt zur Aggregation von MalS	59
4.1.2.8	MalS kann durch das Detergens SDS denaturiert werden	60
4.1.2.9	Die Disulfidbrücken von MalS haben keinen Einfluß auf die thermische Stabilität des Proteins	61
4.1.2.10	Reduziertes MalS kann reoxidiert werden	62

4.1.2.11	Acarbose ist ein schwacher Inhibitor für MalS	62
4.2	Elektronenmikroskopie von MalS	63
4.2.1.	MalS ist ein globuläres Protein	63
4.2.2	Bestimmung der Größe und des Molekulargewichts von MalS anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen	64
4.3	Kartierung der Disulfidbrücken in MalS durch ESI-MS	65
4.4	Bestimmung des Molekulargewichtes von MalS durch analytische Ultrazentrifugation	66
4.5	Charakterisierung der Faltung von MalS <i>in vivo</i>	66
4.5.1	Die Faltung von MalS ist <i>in vivo</i> abhängig von dem Faltungshelfer DsbA	66
4.5.2	Pulse-Chase-Experimente zum Studium der Kinetik der Disulfidbrückenausbildung und der Stabilität von MalS in einer <i>dsbA::kan</i> -Mutante	67
4.5.3	Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS ist unabhängig von der Disulfidbrücken-Isomerase DsbC	68
4.5.4	Die Prolinisoamerase FkpA hat keinen Einfluß auf die Faltung von MalS	68
4.5.5	Die Identifikation der Protease, die falsch gefaltetes MalS abbaut	68
4.5.5.1	Falsch gefaltetes MalS wird durch die Protease DegP abgebaut	69
4.5.5.2	DegQ und DegS sind nur gering am Abbau von falsch gefaltetem MalS beteiligt	69
4.5.6	In einem <i>dsbA</i> ⁺ -Stamm ist die Faltung von MalS nicht auf DegP angewiesen	69
4.5.7	Der Einfluß von DegP _{S210A} auf die Faltung von MalS	70
4.5.7.1	DegP _{S210A} unterstützt die Faltung von MalS in einem <i>dsbA-degP</i> -Stamm	70
4.5.7.2	Die Aggregation von MalS in einer <i>dsbA-degP</i> -Mutante wird durch die Expression von <i>degP</i> _{S210A} wieder aufgehoben	70
4.5.8	Bestimmung der <i>degP</i> -Expression unter Streßbedingungen durch eine transkriptionale <i>degP-lacZ</i> -Fusion	72
4.5.8.1	Die Zelle erkennt falsch gefaltetes MalS	72
4.5.8.2	Die Reduktion des Faltungsstreß im Periplasma durch DegP _{S210A} wird nicht nur über den CpxA/R-Weg registriert	74
4.5.8.3	Die <i>degP</i> -Expression wird nicht durch eine hohe Osmolarität oder einen niedrigen pH-Wert des Mediums verändert	74
4.5.9	Faltung von MalS im Cytoplasma	76
4.6	Die Faltung von MalS <i>in vitro</i>	78
4.6.1	Die Reinigung von ΔssMalS nach Expression von dem Plasmid pCS13	79
4.6.2	Die Faltung von gereinigtem ΔssMalS kann durch ein Verdünnen des Harnstoffes induziert werden	80
4.6.3	Die Faltung von ΔssMalS wird durch das Redoxpotential bestimmt	80
4.6.4	Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist essentiell für die Faltung von ΔssMalS in die enzymatisch aktive Konformation	81
4.6.5	Die Faltung von ΔssMalS ist abhängig von der Temperatur	82
4.6.6	Der Einfluß von DsbA auf die Faltung von ΔssMalS <i>in vitro</i> ist gering	84
4.6.7	ΔssMalS kann nur bei alkalischem pH-Wert falten	86

4.6.8	PG-6 inhibiert die Faltung von Δ ssMalS	87
4.6.9	Die Faltung von MalS <i>in vitro</i> in Gegenwart von DegP und DegP _{S210A}	87
4.6.9.1	Reinigung von DegP und DegP _{S210A}	87
4.6.9.2	DegP _{S210A} ist proteolytisch inaktiv	89
4.6.9.3	DegP _{S210A} hat keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von MalS	89
4.6.9.4	DegP ist bei der Harnstoffkonzentration im MalS-Faltungspuffer noch proteolytisch aktiv	90
4.6.9.5	DegP und DegP _{S210A} unterstützen die Ausbildung der Disulfidbrücken bei der Faltung von Δ ssMalS	91
4.6.9.6	Die Faltung von Δ ssMalS in der Anwesenheit von DegP _{S210A} erhöht die Ausbeute an aktivem MalS	92
4.6.9.7	Eine Faltung von MalS ohne die Ausbildung der Disulfidbrücken ist auch in Gegenwart von DegP _{S210A} nicht möglich	93
4.7	DegP ist ein allgemeines Chaperon	94
4.7.1	DegP und DegP _{S210A} unterstützen die Rückfaltung von chemisch denaturierter Citrat Synthase	94
4.7.2	DegP _{S210A} kann denaturierte und aggregierte β -Galaktosidase renaturieren	95
4.7.3	Komplementation der Hitzesensitivität eines <i>degP</i> ⁻ -Stammes durch DegP _{S210A}	96
4.8	Analyse der Struktur und Funktion von DegP	97
4.8.1	Charakterisierung durch DegP-Derivate mit Deletionen einzelner Domänen	97
4.8.1.1	Konstruktion der DegP-Derivate	97
4.8.1.2	Expression und Reinigung der <i>degP</i> -Derivate	98
4.8.1.3	Bestimmung des oligomeren Status der DegP-Derivate durch Gelfiltration	103
4.8.1.4	Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der DegP-Derivate durch Resorufin-markiertes Casein	104
4.8.1.5	Chaperonaktivität der DegP-Derivate	104
4.8.1.6	Komplementation der Hitzesensitivität eines <i>degP</i> ⁻ -Phänotyps durch die DegP-Derivate	106
4.8.2	Elektronenmikroskopie von DegP	107
4.8.3	Sekundärstrukturvorhersage von DegP	108
4.8.4	Die PDZ-Domänen von DegP weisen untereinander nur eine geringe Homologie auf	110
4.9	Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP <i>in vitro</i>	111
4.9.1	Abbau von MalS durch DegP	111
4.9.1.1	Ungefaltetes reduziertes MalS	111
4.9.1.2	Natives MalS	112
4.9.1.3	Gefaltetes reduziertes MalS	112
4.9.2	Abbau von MalS durch die DegP-Derivate	113
4.9.2.1	Ungefaltetes reduziertes MalS	113
4.9.2.2	Natives MalS	114
4.9.2.3	Gefaltetes reduziertes MalS	115
4.9.3	Synthetische Peptide als Substrat von DegP	116

4.9.4	Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität von DegP	116
4.9.4.1	Spaltung von Resorufin-markiertem Casein	116
4.9.4.2	Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch DegP	117
4.9.4.3	Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch DegP und die DegP-Derivate	119
4.9.4.4	Tyrosin-Fluoreszenz von DegP in Abhängigkeit von der Temperatur	120
5.	DISKUSSION	121
5.1	Biochemische Charakterisierung und Struktur der α -Amylase MalS	121
5.2	Bedeutung der Disulfidbrücken in MalS für die Faltung	122
5.3	Die Protease DegP ist auch ein Chaperon	127
5.4	Vergleich der Faltung von MalS <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> und Modell des Faltungsablaufs	132
5.5	Struktur- und Funktionsanalyse von DegP	134
5.6	Steuerung der Funktion von DegP über die Temperatur	137
6.	LITERATURVERZEICHNIS	140
7.	ANHANG	157
7.1	Verzeichnis der Abbildungen	157
7.2	Verzeichnis der Tabellen	158

1. ZUSAMMENFASSUNG

Die Faltung von Proteinen in die native Konformation wird *in vivo* durch eine komplexe Maschinerie von Chaperonen und Faltungskatalysatoren unterstützt. Im Cytoplasma von *Escherichia coli* ist die Faltung von Proteinen bereits gut untersucht. Die im Periplasma wirkenden Helfer sind jedoch weitgehend unbekannt.

In der vorliegenden Arbeit wurde als Modellprotein ein periplasmatisches Haushaltsenzym, die α -Amylase MalS aus *E. coli*, ausgewählt, um die Faltung eines periplasmatischen Proteins *in vivo* und *in vitro* zu untersuchen.

Für ein Verständnis des Faltungsablaufs von MalS war es zunächst notwendig, das Protein zu reinigen und biochemisch zu charakterisieren: MalS ist ein globuläres, monomeres Enzym, das Ca^{2+} gebunden hat. Die enzymatische Aktivität ist stark vom pH-Wert abhängig. MalS zeigt eine Stabilität gegenüber hohen Salzkonzentrationen, nicht jedoch gegenüber dem Detergens SDS. Mit dem Substrat p-Nitrophenyl- α -D-Maltohexosid wurden eine K_M von 49 μM und eine v_{max} von 0,36 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein bestimmt.

MalS enthält vier Cysteine; diese bilden zwei Disulfidbrücken, die kartiert wurden. Die Untersuchung der Disulfidbrücken in MalS hat ergeben, daß diese dem nativen Protein keinen Stabilitätsgewinn gegenüber biochemischen Faktoren vermitteln. Ihre Ausbildung ist aber eine Voraussetzung für die erfolgreiche Faltung des Proteins *in vivo* und auch *in vitro*.

Die Lokalisation der Disulfidbrücken ist für eine α -Amylase einmalig. Der N-Terminus von MalS ist nicht homolog zu anderen Amylasen, sondern zeigt Homologie zur apikalen Domäne von GroEL. Seine Aufgabe könnte es sein, während der Faltung als intramolekulares Chaperon zu agieren. Durch die Ausbildung der Disulfidbrücken wird der N-Terminus von MalS an die C-terminale Amylasedomäne herangeführt, um die Faltung dieser Domäne zu vermitteln.

Die Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS wird *in vivo* durch die Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA katalysiert. In Stämmen ohne funktionelles DsbA ist die Faltung von MalS ineffizient. Das falschgefaltete MalS ist unlöslich und wird proteolytisch beseitigt. Als verantwortlich für diesen Abbau konnte die Protease DegP identifiziert werden.

Außerdem wurde für DegP noch die Funktion eines Chaperons gefunden. In einem *dsbA-degP*-Stamm wird MalS nicht gefaltet. Die Expression einer proteolytisch inaktiven Punktmutante von DegP, DegP_{S210A}, ermöglichte wieder eine Faltung von MalS. Dies zeigte, daß DegP *in vivo* nicht nur den Abbau von falschgefaltetem MalS vermittelt, sondern auch die Faltung unter Streßbedingungen. Auch *in vitro* konnte die Faltung von MalS durch DegP unterstützt werden. Es wurde eine Beziehung von Faltung versus Abbau in Abhängigkeit von der Temperatur bestimmt.

DegP wird als ein allgemeines Chaperon postuliert. Neben MalS, als Substrat der Chaperonaktivität von DegP, konnte auch eine Unterstützung der Faltung der β -Galaktosidase und Citrat Synthase *in vitro* durch DegP gefunden werden.

Eine Struktur- und Funktionsanalyse von DegP war anhand konstruierter Derivate, bei denen einzelne Domänen deletiert sind, möglich. Beide PDZ-Domänen sind für die Oligomerisierung des Moleküls und eine effiziente proteolytische Funktion wichtig. Dies könnte auf einer kooperativen Wechselwirkung der Untereinheiten durch die Oligomerisierung beruhen. Für die Chaperonaktivität haben die PDZ-Domänen keine Bedeutung, diese scheint allein durch die katalytische Domäne vermittelt zu werden.

Der Wechsel vom Chaperon zur Protease ist bei DegP über die Temperatur gesteuert. Mit steigender Temperatur nimmt die proteolytische Aktivität zu und überlagert die Chaperonaktivität. Als Regulationsmechanismus für diesen Wechsel wird eine Konformationsänderung, die eine Verlagerung des Serins der katalytischen Triade kontrolliert, vorgeschlagen.

Die Protease DegP ist somit ein bifunktionelles Protein: Chaperon und Protease. Die zwei Funktionen innerhalb eines Moleküls erlauben der Zelle eine schnelle und präzise Entscheidung über das Schicksal entfalteter Proteine: Faltung oder Abbau!

2. EINLEITUNG

„Proteine falten spontan, und der Faltungsablauf ist in der Primärstruktur des Proteins determiniert“.

Dieses Konzept wurde aus den ersten Experimenten von Christian B. Anfinsen zur Untersuchung der Proteinfaltung abgeleitet (Anfinsen, 1973). In seinen Experimenten konnte die Faltung von chemisch denaturierter RNaseA *in vitro* durch ein einfaches Verdünnen in eine wäßrige Lösung initiiert werden. Dabei werden hydrophobe Aminosäuren im Kern des Proteins und hydrophile auf der Oberfläche angeordnet. Die Gruppierung der Aminosäuren im gefalteten Protein nach diesem Prinzip ist inzwischen allgemeingültig. Mittlerweile ist bekannt, daß die Faltung *in vivo* und auch die vieler Proteine *in vitro* abhängig ist von anderen Proteinen, sogenannten Faltungshelfern (Beissinger und Buchner, 1998). Ohne das Zusammenspiel von Faltungshelfern und faltendem Protein würde es zu falsch gefalteten Intermediaten kommen, die in thermodynamischen Sackgassen verbleiben. Dies führt schließlich zur Aggregation vieler Proteine und wäre letal für die Zelle.

Das Maltosesystem von *E. coli* dient der effektiven Verwertung von Maltooligosacchariden (Schwartz, 1987). Die Proteine dieses Systems sind gut charakterisierte Haushaltsenzyme. Ihre Synthese und Faltung finden unter den verschiedensten Bedingungen statt, und sie müssen deshalb einer ständigen Qualitätskontrolle durch Proteasen und Chaperone unterliegen. Aufgrund dieser Anforderungen stellen die Proteine des Maltosesystems ein geeignetes Modell für das Studium der Proteinfaltung *in vivo* dar.

2.1 Das Maltosesystem von *Escherichia coli*

Die Aufnahme von Dextrinen aus dem umgebenden Medium beginnt mit der Diffusion der Dextrine durch die Pore LamB in den periplasmatischen Raum (Freundlieb et al., 1988) (Schirmer et al., 1995). Die Gene *malK*, *malF* und *malG* kodieren für die Proteine des Maltose ABC-Transportsystems in der Cytoplasmamembran (Froshauer und Beckwith, 1984) (Dassa und Hofnung, 1985). MalE ist das periplasmatische Bindeprotein für Maltose und Maltodextrine (Kellermann und Szmelcman, 1974). Gleichzeitig ist MalE chemotaktischer Vermittler zur Auffindung von Maltose. Nach der Bindung von MalE an Maltodextrine erfolgt eine Konformationsänderung, wodurch die Übergabe an den MalFGK-Komplex und der anschließende Transport ins Cytoplasma möglich werden.

2.1.1 Dextrinspaltende Enzyme des Maltosesystems

Das durch den MalFGK-Komplex gebildete Transportsystem kann Maltose und Maltodextrine bis zu einer Gesamtlänge von sieben Glucoseeinheiten vom Periplasma in das Cytoplasma transportieren (Hengge und Boos, 1983) (Shuman, 1982). Für die Verwertung längerer Maltodextrine muß im Periplasma erst eine Spaltung in kurzkettige Maltodextrine stattfinden. Dies wird durch die im Periplasma lokalisierte α -Amylase MalS (Freundlieb et al., 1988) katalysiert.

Neben MalS sind in *E. coli* noch drei weitere dextrinspaltende Enzyme bekannt: MalP (Schwartz und Hofnung, 1967) (Hofnung et al., 1971), MalQ (Palmer et al., 1976) (Pugsley

und Dubreuil, 1988) und MalZ (Tapio et al., 1991). Diese drei Proteine sind aber cytoplasmatisch lokalisiert und sind für die Verwertung und Verstoffwechslung der Dextrine verantwortlich.

2.1.2 Die α -Amylase MalS

Das *mals*-Gen kodiert für ein Protein von 676 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 75 644 Da (Schneider et al., 1992). Das reife Protein beginnt mit der Aminosäure 18. Die ersten 17 Aminosäuren dienen als Signalsequenz für den Export des Proteins in das Periplasma. Nach der Abspaltung der Signalsequenz hat MalS ein theoretisches Molekulargewicht von 73 961 Da.

MalS zeigt nicht die für α -Amylasen typische endolytische stärke-spaltende Aktivität. Das Hauptspaltprodukt bei der Inkubation von MalS mit Maltodextrinen mit einer Länge von mehr als sechs Glucoseeinheiten ist Maltohexose (Schneider et al., 1992). Auffällig ist daher auch das Verhalten gegenüber p-Nitrophenyl-Maltooligosacchariden, einem chromogenen Analogon zu den Maltooligosacchariden. Die p-Nitrophenyl-Maltooligosaccharide werden als artifizielle Substrate für Amylasen eingesetzt. Sie sind aufgebaut aus einer Oligosaccharidkette definierter Länge, an deren reduzierendem Ende eine Nitrophenylgruppe sitzt. Durch die Abspaltung der Nitrophenylgruppe kommt es zur Freisetzung von p-Nitrophenol. Dies führt zu einer Gelbfärbung des Versuchsansatzes. Die Substratspezifität der Amylasen kann deshalb durch p-Nitrophenyl-Maltooligosaccharide unterschiedlicher Kettenlänge bestimmt werden. Das Enzym MalS setzt p-Nitrophenol wesentlich schneller aus p-Nitrophenyl-Maltohexosid (PG-6) frei als aus p-Nitrophenyl-Maltoheptosid. Dies zeigt, daß der Reaktionsmechanismus über das nichtreduzierende Ende der Polysaccharidkette läuft und bevorzugt Maltohexoside freigesetzt werden (Boos und Shuman, 1998). Die Freisetzung von Glucose vom nichtreduzierenden Ende ist normalerweise ein Charakteristikum von β -Amylasen. Da bei MalS jedoch eine Sequenzhomologie zu den α -Amylasen besteht, findet die Zuordnung zu diesen statt, obwohl der Reaktionsmechanismus dem der β -Amylasen entspricht (Schneider et al., 1992). MalS spaltet auch Cyclodextrine in die entsprechenden linearen Dextrine. Cyclodextrine haben kein freies Ende und sind deshalb kein Substrat für β -Amylasen (Freundlieb und Boos, 1986).

2.1.2.1 Homologie von MalS zu anderen Amylasen

MalS zeigt eine Homologie zu verschiedenen anderen α -Amylasen. Die größte Homologie wurde bei der α/β Amylase von *Bacillus polymyxa* (30,8 %), der Cyclodextrin-Glycosyltransferase von *Klebsiella pneumoniae* (28,4 %) und der α -Amylase von *Aspergillus oryzae* (33,3 %) bestimmt (Schneider et al., 1992).

Bei den α -Amylasen wurde eine Homologie in vier Bereichen der Primärstruktur beobachtet. Diese vier Regionen bilden die Substratbindestelle, die Ca^{2+} -Bindestelle und das katalytische Zentrum; sie sind auch in MalS konserviert. In MalS sind diese Segmente jedoch im Vergleich zu anderen α -Amylasen weiter zum C-Terminus versetzt, da MalS eine N-terminale Erweiterung mit einer Länge von ca. 200 Aminosäuren besitzt, die nicht in anderen Amylasen gefunden wird (Svensson, 1994).

Die meisten Amylasen, die Disulfidbrücken ausbilden, haben vier konservierte Cysteine. In MalS ist nur eines dieser vier konservierten Cysteine vorhanden, obwohl MalS zwei Disulfidbrücken ausbildet (vorliegende Arbeit).

2.1.2.2 Tertiärstruktur von Amylasen

Die Cyclodextrin-Glucanotransferasen, α -Amylasen und α -Glucosidasen katalysieren alle die Spaltung von α -1,4-glycosidischen Bindungen in Maltooligosacchariden oder Polysacchariden, wie z. B. Amylose und Amylopektin (MacGregor und Svensson, 1989). Es ist daher nicht verwunderlich, daß in dem aktiven Zentrum dieser drei verschiedenen Enzyme Bereiche starker Homologie existieren (Janecek, 1993).

Die α -Amylasen aus verschiedenen Organismen scheinen eine gleiche Supersekundärstruktur zu haben, obwohl sie stark in ihrer Aminosäuresequenz variieren (MacGregor und Svensson, 1989). Die ersten 400 Aminosäuren des N-Terminus bilden ein $(\alpha/\beta)_8$ -Faß (Wiegand et al., 1995). In dieser Struktur formen acht parallele β -Stränge den Kern, der von acht α -Helices umgeben ist. Die β -Stränge und α -Helices sind alternierend durch kurze Schleifen miteinander verknüpft. Die Schleife zwischen dem dritten β -Strang und der dritten α -Helix ist vermutlich an der Substratbindung beteiligt (Svensson, 1994). In einer weiteren Schleife liegt eine Ca^{2+} -Bindestelle (Boel et al., 1990). Der C-Terminus der α -Amylasen variiert stark in seiner Länge. Eine mögliche Funktion für den C-Terminus ist noch nicht bekannt.

2.2 Die Proteinfaltung im Cytoplasma von *Escherichia coli*

Das Cytoplasma ist nicht nur das Kompartiment, in dem sich das bakterielle Chromosom, der Replikationsapparat und die Enzyme des Stoffwechsels befinden, sondern ist auch der Ausgangspunkt der Synthese aller Proteine. Während oder nach der Translation des Proteins am Ribosom findet eine Sortierung in Proteine, die im Cytoplasma verbleiben, und solchen, die transloziert werden, statt. Aufgrund dieser Trennung sind beide auf verschiedene Faltungsmaschinerien angewiesen, und so gibt es Gemeinsamkeiten bei der Faltung, aber auch kompartimentspezifische Unterschiede. Es gibt Proteine, die in beiden Zellkompartimenten falten können, und solche, deren Faltung kompartimentspezifisch ist. Bei den Faltungshelfern muß zwischen Chaperonen und Faltungskatalysatoren differenziert werden. Chaperone verhindern die Aggregation von denaturierten Proteinen und werden in allgemeine und spezifische Chaperone untergliedert. Die allgemeinen Chaperone haben eine sehr breite Substratspezifität, wohingegen die spezifischen Chaperone die Faltung weniger oder gar nur eines Proteins unterstützen können. Im Gegensatz zu den Chaperonen modifizieren Faltungskatalysatoren ein Protein bei der Faltung chemisch, wobei die Peptidbindung selbst oder eine Aminosäureseitenkette betroffen sein kann.

2.2.1 Die Faltungshelfer im Cytoplasma

Im Cytoplasma ist bereits eine Vielzahl von allgemeinen und spezifischen Chaperonen bekannt und gut charakterisiert. Wichtige Vertreter sind die DnaK-Chaperonmaschine, bestehend aus den Proteinen DnaK, DnaJ und GrpE, und der GroEL/ES-Komplex. Beide Systeme sind nicht nur für eine effiziente *de novo* Faltung von Proteinen essentiell, sondern auch bei

der Antwort auf zellulären Streß. Die Chaperone binden ihre Substrate über eine Domäne, die hydrophobe Elemente im Zielprotein erkennt. Die Bindung und Freisetzung des Substrats geschieht in beiden Fällen durch eine von ATP-Bindung und -Hydrolyse vermittelte Konformationsänderung des Chaperons (Bukau und Horwich, 1998). Für die vollständige Faltung eines Proteins sind mehrere Zyklen von Bindung und Freisetzung erforderlich.

Die einzigen im Cytoplasma bekannten Faltungskatalysatoren sind Peptidyl-Prolyl-*cis-trans*-Isomerasen (PPIasen). PPIasen sind ubiquitäre Proteine; sie katalysieren die *cis-trans*-Isomerisierung von Peptidyl-Prolyl-Bindungen in Peptiden und Proteinen (Fischer et al., 1984). PPIasen können in drei Familien unterteilt werden (Rudd et al., 1995). Charakteristisch für die einzelnen Familien ist eine Hemmung durch spezifische Immunsuppressiva wie Cyclosporin, FK506 und Rapamycin. PPIasen sind im Cytoplasma und im Periplasma von *E. coli* lokalisiert. Die drei im Cytoplasma identifizierten PPIasen sind Trigger Faktor (Hesterkamp et al., 1996), PPIb (Hayano, 1991) und PPIc (Wulfing et al., 1994).

2.2.2 Das Redoxpotential im Cytoplasma

Das Cytoplasma ist ein reduzierendes Milieu; die Proteine im Cytoplasma bilden deshalb keine stabilen Disulfidbrücken. Eine Ausnahme sind die Proteine Hsp33 (Jacob et al., 1999) und OxyR (Zheng et al., 1998), deren Funktion durch eine Disulfidbrücke vermittelt oder gesteuert wird. Wird der Redoxstatus des Cytoplasmas gestört, reagiert die Zelle sofort darauf und reguliert das Redoxpotential durch verschiedene Mechanismen wieder auf den Sollwert (Åslund und Beckwith, 1999).

Der reduzierende Status des Cytoplasmas wird durch zwei unabhängige Systeme aufrechterhalten (Abbildung 2-1).

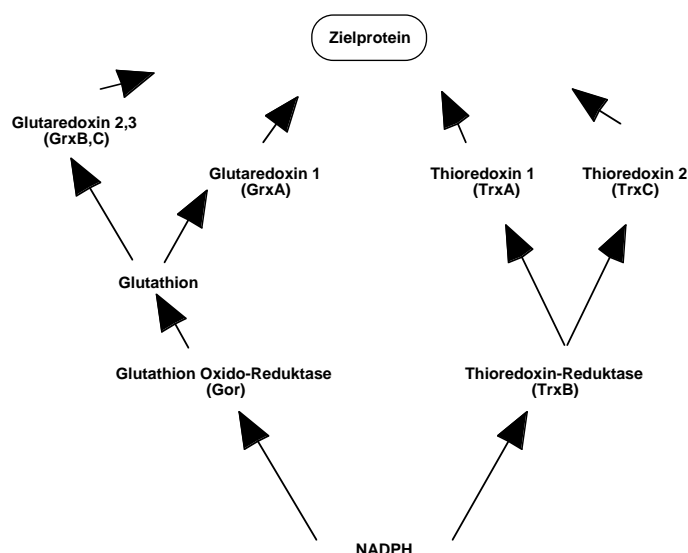


Abb. 2-1. Reduktion von Disulfidbrücken in cytoplasmatischen Proteinen (nach Stewart et al. (Stewart et al., 1998)).

Die Pfeile geben den Reduktionsweg der Disulfidbrücken an.

Thioredoxin/Thioredoxin-Reduktase System:

Disulfidbrücken in cytoplasmatischen Proteinen werden bei diesem System durch Thioredoxin 1 (TrxA) oder Thioredoxin 2 (TrxC) reduziert. Die Thioredoxine werden dabei selber oxidiert und müssen durch Thioredoxin-Reduktase (TrxB) wieder reduziert werden. Die Regeneration des oxidierten TrxB erfolgt durch NADPH (Derman et al., 1993) (Stewart et al., 1998).

Glutathion/Glutaredoxin System:

Die Disulfidbrücken im Zielprotein werden bei diesem System durch Glutaredoxin 1, 2 oder 3 (GrxA, B, C) reduziert. Die Regeneration, des bei diesen Prozessen entstehenden oxidierten Glutathion, wird durch die Glutathion Oxido-Reduktase (Gor) katalysiert (Stewart et al., 1998).

2.3 Die Proteinfaltung im Periplasma von *Escherichia coli*

Die Proteine des Periplasmas werden im Cytoplasma synthetisiert und anschließend an ihren Bestimmungsort transportiert. Da für diese Translokation das Protein in einem ungefalteten Zustand vorliegen muß, darf die Faltung erst im Periplasma stattfinden (Pugsley, 1993). Im periplasmatischen Raum befindet sich deshalb eine eigene Faltungsmaschinerie.

2.3.1 Die Translokation von Proteinen über die Cytoplasmamembran

Sekretorische Proteine tragen vor dem reifen Teil des Proteins eine Signalsequenz, die eine Sortierung der Proteine bewirkt (Inouye und Beckwith, 1997). Die Signalsequenz wird nach der Translokation ins Periplasma durch eine spezielle Protease (z. B. LepB) abgespalten (Dalbey und Heijne v. , 1992).

Für einen post-translationalen Transport müssen die Proteine nach der Synthese den Translokationskomplex in einem ungefalteten Zustand erreichen (Randall et al., 1990). Um eine Faltung oder Aggregation auf diesem Weg zu verhindern, dienen zum einen die Signalsequenz selbst (Park et al., 1988) (Laminet und Plückthun, 1989), zum anderen auch Chaperone. Insbesondere SecB ist auf diesen Transport spezialisiert (Lecker et al., 1990) (Kumanoto, 1991); seine Beteiligung ist jedoch nicht bei allen exportierten Proteinen notwendig. DnaJ/K und GrpE sind zusammen mit anderen Hitzeschockproteinen am Export von SecB-unabhängigen Vorläuferproteinen beteiligt (Wild et al., 1996). Die Hitzeschockproteine DnaJ/K und GroEL/S können die SecB-Funktion während der Proteintranslokation ersetzen (Altman et al., 1991) (Wild et al., 1992) (Wild et al., 1993).

Der komplette Translokationsapparat besteht aus sieben Proteinen: SecA, SecD, SecF, SecY, SecE, SecG und LepB. Der Translokator selbst wird aus den beiden integralen Membranproteinen SecE und SecY gebildet (Nishiyama et al., 1992). Die Interaktion zwischen dem Präprotein und dem Translokator wird durch SecA vermittelt (Oliver, 1993). Die Energie für den Translokationsprozeß liefern das Membranpotential und eine ATP-Hydrolyse (Jacq und Holland, 1993) (Jacobs et al., 1993). SecG beschleunigt die Proteintranslokation *in vitro* (Nishiyama et al., 1993); für die Translokation *in vivo* ist das Protein jedoch nur bei niedrigen Temperaturen essentiell und erleichtert hier möglicherweise die Membraninsertion von SecA (Kontinen und Tokuda, 1995). Die Proteine SecD und SecF sind wahrscheinlich nur an späten

Prozessen der Translokation beteiligt, wie dem Loslösen des translozierten Proteins vom Translokationsapparat (Matsuyama et al., 1993).

Ein Hauptunterschied zwischen Proteinen, die im Cytoplasma verbleiben, und solchen, die exportiert werden, scheint die Geschwindigkeit der Faltung zu sein: die cytoplasmatischen Proteine falten schnell, die periplasmatischen hingegen langsam, wodurch eine Translokationskompetenz aufrechterhalten wird. Eine Freisetzung des translozierten Proteins vom Translokator erfolgt erst, wenn das Protein in einer korrekt gefalteten Konformation vorliegt (Ito und Beckwith, 1981) (Fitts et al., 1987) (Kamitani et al., 1992). Bei der Faltung vermitteln die Faltungskatalysatoren und Chaperone.

2.3.2 Faltungskatalysatoren im Periplasma

Die Faltungskatalysatoren im Periplasma sind, im Vergleich zu den Chaperonen in diesem Kompartiment, wesentlich besser charakterisiert. Es sind zwei Klassen von Faltungskatalysatoren bekannt:

Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerasen:

Im Periplasma von *E. coli* sind bislang fünf Proteine identifiziert worden, denen man PPIase-Aktivität zuschreibt: RotA (Clubb et al., 1994), SurA (Tormo et al., 1990), PPIID, FkpA und Skp (Missiakas und Raina, 1997a). Sie sollen ebenso wie ihre cytoplasmatischen Vertreter die Isomerisierung von Peptidbindungen in Proteinen (Kapitel 2.2.1) katalysieren.

Disulfidbrückenoxidasen/-reduktasen:

Im Gegensatz zum Cytoplasma ist das Periplasma kein reduzierendes Milieu, d. h. hier können sich Disulfidbrücken in Proteinen ausbilden. Die spontane Ausbildung von Disulfidbrücken würde Stunden oder sogar Tage dauern (Gilbert, 1993). Dies ist natürlich zu langsam für eine wachsende Zelle. Deshalb sind an der Ausbildung von Disulfidbrücken *in vivo* Hilfsproteine beteiligt, wodurch sich die Faltung auf Sekunden reduziert. An der Ausbildung korrekter Disulfidbrücken ist ein Netzwerk aus Disulfidbrücken-Oxidasen, -Reduktasen und -Isomerasen beteiligt (Abbildung 2-2).

Der Hauptkatalysator bei der Disulfidbrückenbildung ist die Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA (Bardwell et al., 1993). Die Ausbildung von Disulfidbrücken ist ein zweistufiger Prozeß, bei dem sich zunächst ein gemischtes Disulfid zwischen DsbA und einem Thiol des Zielproteins ausbildet (Wunderlich et al., 1995) (Wunderlich und Glockshuber, 1993). Im nächsten Schritt reagiert ein zweites Thiol mit dem gemischten Disulfid, und es kommt zur Ausbildung einer Disulfidbrücke im Zielprotein. Die Reoxidation des DsbA geschieht durch das Membranprotein DsbB, das zur Regeneration Ubiquinone und Menaquinone als Elektronenakzeptoren nutzt (Bader et al., 1999). Da in der Sequenz vieler Proteine mehr als zwei Cysteine enthalten sind, kann es hierbei auch zu einer inkorrekten Wahl der Cysteine für eine Disulfidbrücke kommen. Die Disulfidbrücken-Isomerase DsbC löst dieses Problem und arrangiert die falsch ausgebildeten Disulfide neu (Missiakas et al., 1994) (Zapun et al., 1995). Die Regeneration von DsbC erfolgt durch das Membranprotein DsbD (Missiakas et al., 1995). Die Funktion von DsbE ist nicht genau bekannt, es könnte bei der Faltung spezifischer Proteine beteiligt sein (Missiakas und Raina, 1997a).

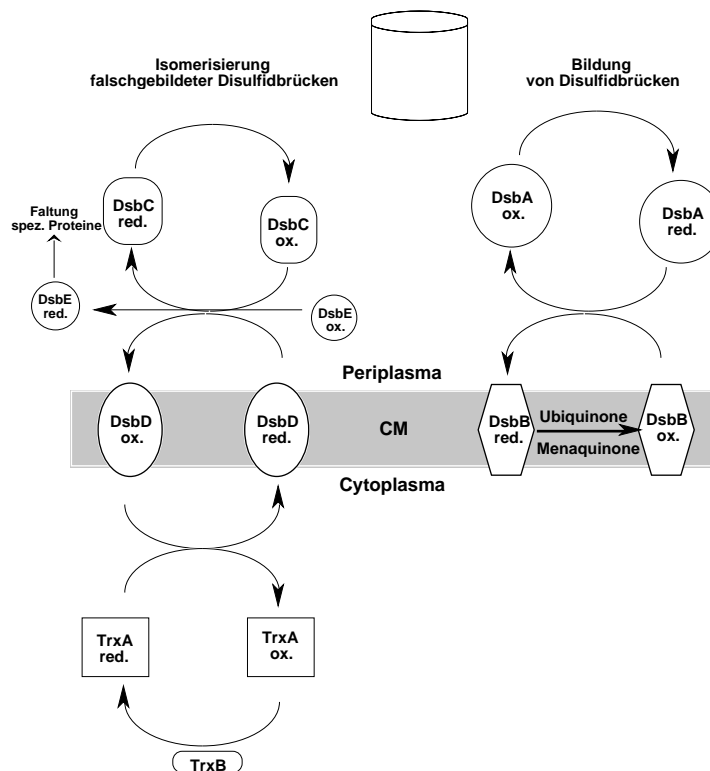


Abb. 2-2. Ausbildung von Disulfidbrücken in periplasmatischen Proteinen (verändertes Modell nach Missiakas und Raina (Missiakas und Raina, 1997a)).

2.3.3 Chaperone im Periplasma

Im Periplasma ist noch kein allgemeines Chaperon bekannt. Aufgrund des Fehlens von ATP in diesem Kompartiment muß ein periplasmatisches Chaperon sich von den cytoplasmatischen ATP-abhängigen Chaperonen unterscheiden. Auch das ATP-unabhängige SecB stellt kein geeignetes Modell dar, da dieses eine ungefaltete Konformation im Zielprotein aufrechterhält und nicht eine Faltung vermittelt (Diamond et al., 1995) (Randall und Hardy, 1995). Viele Möglichkeiten werden diskutiert: die Faltung im Periplasma könnte durch die Substratbindepoteine (Richarme und Caldas, 1997) oder DsbA und die PPIasen (Wang und Tsou, 1998) unterstützt werden. Weitere potentielle Kandidaten für allgemeine periplasmatische Chaperone sind ClpB (Squires et al., 1991), Skp und DegP.

Von Skp ist bekannt, daß es mit den Außenmembranproteinen spezifisch interagiert (Chen und Henning, 1996) (de Cock et al., 1999). Es ist für die frühen Faltungsschritte der Außenmembranproteine notwendig und hilft die periplasmatischen Intermediate löslich zu halten (Schäfer et al., 1999). Skp unterstützt auch die Faltung von rekombinanten Proteinen (Bothmann und Plückthun, 1998) (Hayhurst und Harris, 1999).

Bass et al. (Bass et al., 1996) postulieren eine Beteiligung der periplasmatischen Protease DegP an der Faltung von neu translozierten oder denaturierten Proteinen. Gestützt wird diese Hypothese auf das Vorkommen eines DegP-Homologs aus *Rickettsia tsutsugamushi*, bei dem alle drei proteolytisch wichtigen Reste des aktiven Zentrums nicht konserviert sind. Experimentelle Daten, die eine Chaperonaktivität belegen, fehlten bislang. In der vorgelegten Arbeit werden erstmals solche Daten vorgestellt.

Spezifische periplasmatische Chaperone existieren für einige Multiproteinkomplexe, Pilis oder Fimbrien (Hultgren et al., 1993). Am besten charakterisiert ist bislang das PapD-Protein, das für den Zusammenbau des P-Pilus verantwortlich ist (Holmgren und Bränden, 1989) (Kuehn et al., 1993). Eine Verwandtschaft von PapD mit den kleinen Hitzeschockproteinen wird aufgrund homologer Domänen diskutiert (Zav'yalov et al., 1995).

2.4 Das Schicksal falsch gefalteter Proteine

Falsch gefaltete Proteine treten entweder bei fehlgelaufener Proteinfaltung oder durch Denaturierung nativer Proteine bei Streß auf. Bei der Entfaltung von Proteinen werden die hydrophoben Elemente exponiert; dies führt zur Aggregation der Proteine. Solche Aggregate sind lebensbedrohlich für die Zelle. Um auf diese Situation zu reagieren, hat die Zelle zwei Möglichkeiten: i) die Verhinderung der Aggregation und das Auflösen bestehender Aggregate durch Chaperone und ii) die Beseitigung der Aggregate durch Proteasen. Diese beiden Wege sind sicherlich miteinander verbunden, so daß Proteine, die von den Chaperonen nicht mehr „gerettet“ werden können, an Proteasen zum Abbau übergeben werden (Wang und Tsou, 1998). Eine zentrale Rolle im Abbau von falsch gefalteten Proteinen im Periplasma wird der Protease DegP zugeschrieben.

2.5 Die periplasmatische Protease DegP

DegP ist eine Protease im Periplasma von *E. coli*; Synonyme für DegP sind HtrA (Lipinska et al., 1988) und Do (Seol et al., 1991). Das *degP*-Gen kodiert für ein Vorläuferprotein mit 474 Aminosäuren. Nach der Translokation in das Periplasma und der Abspaltung der Signalsequenz (Lipinska et al., 1988), umfaßt das reife Protein 448 Aminosäuren (46 829 Da).

Die proteolytische Spaltung der Substrate erfolgt ATP-unabhängig (Laskowska et al., 1996). Dies ist auch notwendig, da im Periplasma Phosphatasen und Nukleasen das Vorkommen von ATP ausschließen (Rosen, 1987). DegP ist eine Serinprotease (Skórko-Glonek et al., 1995b) und gehört zur Peptidasen-Familie S1C des Clans PA (Rawlings und Barrett, 1999). Die Proteasen dieses Clans haben im aktiven Zentrum eine katalytische Triade aus den räumlich benachbarten Aminosäuren Serin/Cystein (Nukleophil), Aspartat (Elektrophil) und Histidin (Base) (Rawlings und Barret, 1994). Die geometrische Orientierung der Triade ist, anhand der bislang vorliegenden Strukturen zu schließen, zwischen den Familien sehr ähnlich, obwohl die Proteine der einzelnen Familien z. T. eine sehr unterschiedliche Struktur aufweisen. In der Abbildung 2-3 ist, zur Veranschaulichung der Organisation des aktiven Zentrums, die Struktur der α -lytischen Endopeptidase aus *Bacillus subtilis* dargestellt. Diese gehört zur selben Familie wie DegP.

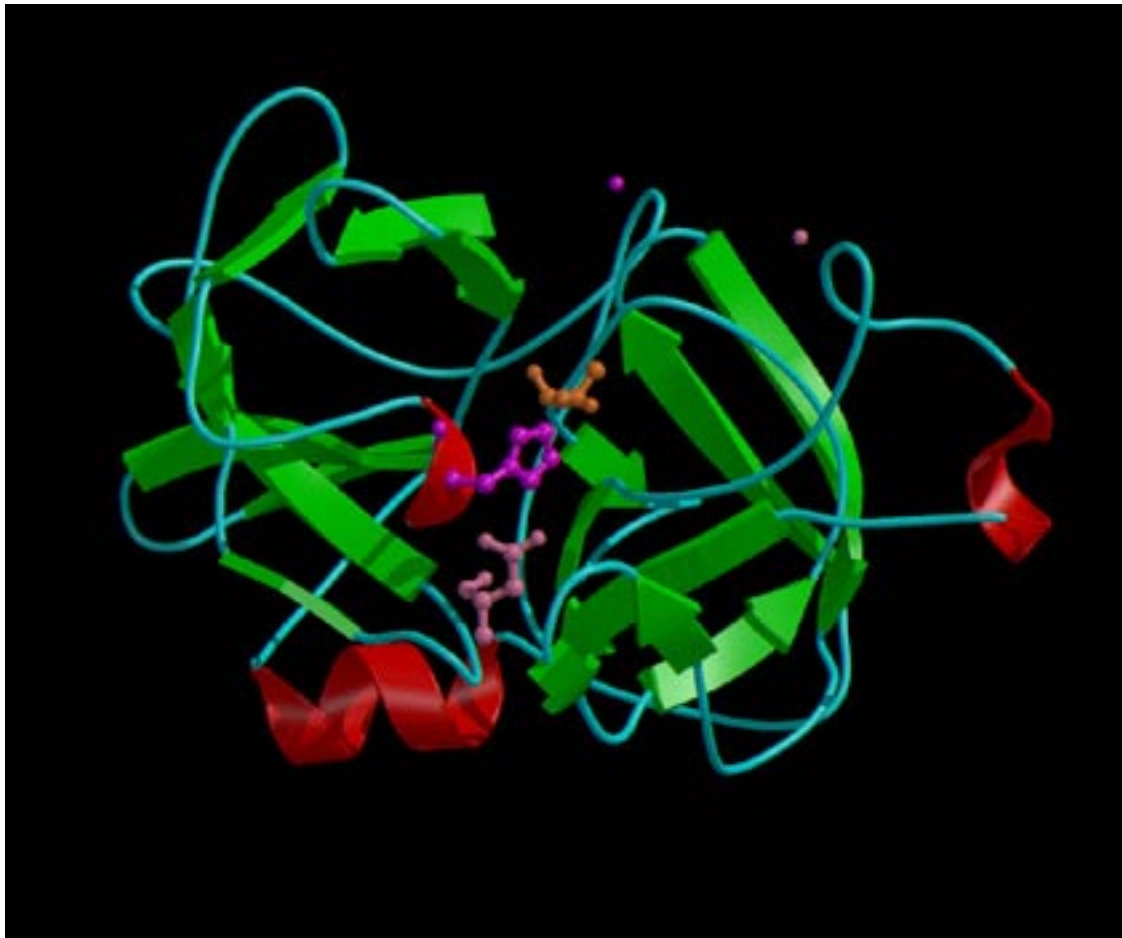


Abb. 2-3. Proteinstruktur der α -lytischen Endopeptidase aus *Bacillus subtilis* (Quelle: MEROPS-the Peptidase Database').

Die Reste der katalytischen Triade sind in Violett (Histidin), Rosa (Aspartat) und Orange (Serin) abgebildet.

DegP wurde in *E. coli* aufgrund zweier Phänotypen identifiziert: i) eine Thermosensitivität (Lipinska et al., 1988) und ii) einem verminderten Abbau von abnormalen periplasmatischen Proteinen (Strauch und Beckwith, 1988) (Strauch et al., 1989). Dies deutet darauf hin, daß eine Hauptfunktion von DegP im Abbau falsch gefalteter Proteine im Periplasma liegt. Die Substratspezifität ist dabei gering, da durch DegP eine Vielzahl von Hybridproteinen (Strauch und Beckwith, 1988) (Guigueno et al., 1997), rekombinanten Proteinen (Banexy und Georgiou, 1991) (Arslan et al., 1998) und falsch gefalteten periplasmatischen Proteinen (Betton et al., 1998) (Sone et al., 1997) und das ColicinA (Cavard, 1995) abgebaut werden.

Neben der proteolytischen Aktivität von DegP wird auch eine Chaperonaktivität diskutiert (Bass et al., 1996) (Pallen und Wren, 1997).

2.5.1 Die Struktur von DegP

Die Monomere von DegP sind zu oligomeren Komplexen organisiert. Dabei stellen die größten Komplexe Dodecamere dar, die vermutlich durch eine Dimerisierung von Hexameren oder einer Tetramerisierung von Trimeren gebildet werden (Kolmar et al., 1996).

¹ <http://www.bi.bbsrc.ac.uk/Merops/Merops.htm>

DegP kann in mehrere Domänen unterteilt werden (Abbildung 2-4). Am N-Terminus befindet sich eine Domäne aus 49 Aminosäuren mit unbekannter Funktion. Auf diese folgt, durch einen Q-Linker getrennt, die katalytische Domäne. Ein Q-Linker ist ein flexibles Segment, das zwei Domänen miteinander verbindet (Wootton und Drummond, 1989). Es ist eine glutamin-, prolin- und serinreiche Region. Die katalytische Domäne enthält das aktive Zentrum (Lipinska et al., 1990), in der sich die katalytische Triade befindet. Zu dieser gehören das Histidin-105, Aspartat-135 und Serin-210 (Rawlings und Barret, 1994). Am C-Terminus von DegP sind zwei PDZ-Domänen lokalisiert (Fanning und Anderson, 1996) (Ponting, 1997) (Songyang et al., 1997). Diese Domänen sind 80 bis 100 Aminosäuren lang und wurden ursprünglich nach drei eukaryotischen Proteinen („post-synaptic density protein“, „disc large“ und „zo-1-Protein“), in denen sie zunächst gefunden wurden, benannt. Die PDZ-Domänen vermitteln eine Protein-Protein-Interaktion (Saras und Heldin, 1996).

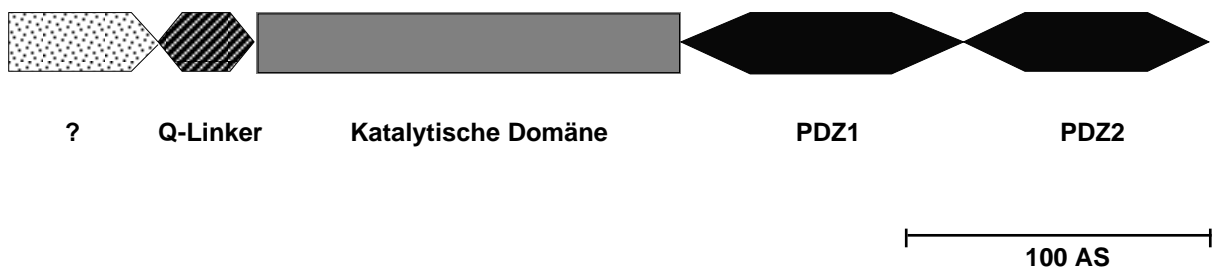


Abb. 2-4. Domänenstruktur von DegP.

Die Sekundärstruktur von DegP besteht hauptsächlich aus β -Strängen (Skórko-Glonek et al., 1995a). Als dreidimensionale Struktur ist deshalb für die Proteasedomäne ein doppeltes, antiparalleles β -Faß und für die PDZ-Domänen ein β -Sandwich vorgeschlagen worden (Skórko-Glonek et al., 1995a) (Fanning und Anderson, 1996).

2.5.2 Die Regulation der *degP*-Expression in der Zelle

Die Expression von *degP* wird durch ein komplexes System reguliert, bei dem zwei Signaltransduktionswege miteinander verzahnt sind. Eine wichtige Aufgabe bei der Regulation haben dabei i) der Antisigmafaktor RseA und der alternative Sigmafaktor RpoE, ii) das Zweikomponentensystem CpxA/CpxR und iii) die zwei Phosphoproteinphosphatasen PrpA und PrpB. Ein Modell der Signaltransduktionswege ist in der Abbildung 2-5 dargestellt.

Das RpoE-Regulon:

Die Transkription des *degP*-Gens ist von dem alternativen Sigmafaktor RpoE abhängig (Lipinska et al., 1988). Die Aktivität von RpoE wird als Antwort auf falsch gefaltete Proteine im Periplasma und Hitzestress stimuliert (Missiakas und Raina, 1998). Eine Modulation der Aktivität von RpoE vermitteln die Proteine RseA, RseB und RseC. RseA ist ein integrales Membranprotein der Cytoplasmamembran. RseB ist ein periplasmatisches Protein und hat eine RseA-Bindestelle. Es reguliert die Interaktion zwischen RseA und RpoE und kann so zur Freisetzung von an RseA gebundenes RpoE führen (Schurr et al., 1996) (Xie et al., 1996). Als

Signal für RseA und RseB dient vermutlich an eine „Receiver Domäne“ gebundenes falsch gefaltetes Protein (Missiakas und Raina, 1997b). Im Gegensatz zu RseA und RseB, die beide die RpoE-Aktivität negativ regulieren, ist RseC ein positiver Regulator (Missiakas und Raina, 1997b). Der Mechanismus der Modulation durch RseC ist noch unbekannt.

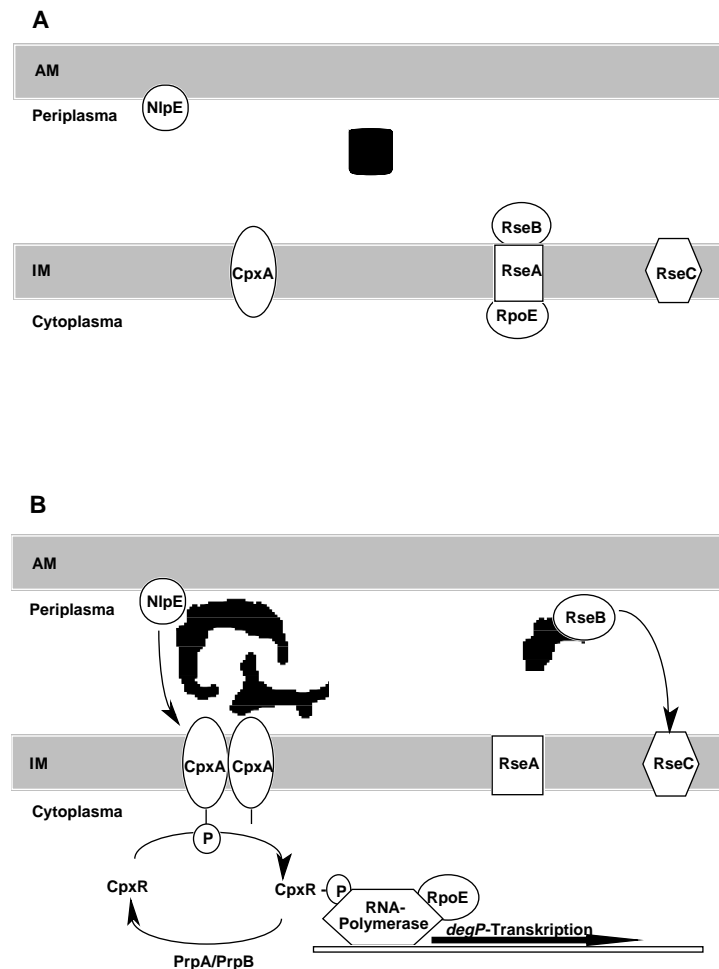


Abb. 2-5. Regulation der *degP*-Expression (verändertes Modell nach Missiakas und Raina (Missiakas und Raina, 1997b)).

Die Abbildung zeigt in (A) den Zustand der Regulationskaskade bei dem Vorliegen von korrekt gefaltetem Protein im Periplasma und in (B) die Aktivierung der *degP*-Transkription durch ungefaltete Proteine.

Abkürzungen: AM Außenmembran; IM Innenmembran; P Phosphat.

Das Zweikomponentensystem CpxA/CpxR:

Zusätzlich zu RpoE wird die *degP*-Transkription noch über einen zweiten Signaltransduktionsweg reguliert. Dieser wird durch das CpxA- und CpxR-Zweikomponentensystem vermittelt (Danese et al., 1995) (Danese und Silhavy, 1997). CpxA fungiert hierbei als Sensorkinase und CpxR als Responseregulator. Das System reguliert die *degP*-Transkription positiv. CpxA ist ein Membranprotein und könnte über seine periplasmatische Domäne das Auftreten falsch gefalteter Proteine durch ihre Bindung erkennen. Dies führt zu einer Aktivierung von CpxR durch eine Phosphorylierung (Dong et al., 1993) (Pogliano et al., 1997). Bei der Erkennung von falsch gefalteten Proteinen im Periplasma könnte auch das Lipoprotein NlpE vermitteln (Snyder et al., 1995).

Die Phosphoproteinphosphatasen PrpA und PrpB:

PrpA ermöglicht eine Feinregulation der Aktivität der Cpx-Proteine. Phospho-CpxR (P-CpxR) wird durch PrpA dephosphoryliert und damit inaktiviert. Eine Überexpression von PrpA hat zudem einen positiven Effekt auf die *degP*-Transkription. Hieraus lassen sich zwei mögliche Modelle ableiten: Dephosphorylierung von P-CpxR erhöht den Turnover der Bindung an den *degP*-Promotor oder vermindert die Bindung von mehreren P-CpxR Proteinen an niederaffinen Bindestellen, wodurch die Transkription unterbrochen wird (Missiakas und Raina, 1997b) (Missiakas und Raina, 1997c).

PrpB ist eine zu PrpA homologe Phosphatase, die vermutlich auch an der Feinregulation des Cpx-abhängigen Signaltransduktionsweges beteiligt ist.

2.5.3 DegP Homologe

In *E. coli* existieren noch zwei zu DegP homologe Proteine: DegQ und DegS (auch als HhoA und HhoB bezeichnet) (Bass et al., 1996) (Waller und Sauer, 1996). Die Regulation erfolgt durch unterschiedliche RpoE-unabhängige Promotoren. Die Homologie beschränkt sich nicht nur auf die Aminosäuresequenz, sondern – zumindest bei DegQ – auch auf die Funktion (Kolmar et al., 1996): i) eine Überexpression von DegQ kann die Thermosensitivität von *degP*-Mutanten komplementieren, ii) eine Serinproteaseaktivität von DegQ war *in vitro* nachweisbar und iii) das Protein bildet ebenso wie DegP oligomere Komplexe aus. Die Funktionen von DegP und DegQ scheinen miteinander zu überlappen, die von DegS weicht jedoch deutlich von diesen ab (Waller und Sauer, 1996).

DegP-Homologe wurden in zahlreichen Prokaryoten und Eukaryoten beschrieben. Auch in vielen höheren Organismen (*Homo sapiens* eingeschlossen) finden sich homologe Proteine. Die Homologie beschränkt sich dabei nicht nur auf die Proteasedomäne, sondern z. T. auch auf eine oder beide PDZ-Domänen. Bakterien mit Nullmutationen in solchen Homologen weisen viele überlappende Phänotypen auf wie Thermosensitivität, verringerte pH-Toleranz, erhöhte Sensitivität auf oxidativen und osmotischen Streß und Unterschiede im Überleben in Makrophagen oder Labortieren (Baumler et al., 1994) (Johnson et al., 1991).

2.5.4 DegP als Werkzeug in der Biotechnologie und Pharmazie

Aufgrund der zentralen Rolle von DegP in der Kontrolle der Proteinstabilität, bei vielen bakteriellen Infektionen und dem ubiquitären Vorkommen von DegP, hat das Protein in den letzten Jahren eine starke Bedeutung bei den verschiedensten medizinischen und industriellen Problemstellungen erhalten.

Klonierungswirte:

Nachdem DegP für den Abbau von Hybridproteinen und falsch gefalteten Proteinen verantwortlich ist, war es naheliegend, *degP*-Stämme als Wirte für die Expression instabiler Proteine zu verwenden. Erfolgreiche Beispiele hierfür sind bei Derivaten des Diphtherietoxins (Zdanovsky et al., 1992), mehreren Enterotoxinmutanten (Wülfing und Rappuoli, 1997) und der S1-Untereinheit des Pertussistoxins (Barbieri et al., 1990) beschrieben worden.

Vakzine:

Für die Virulenz vieler pathogener Bakterien ist ein funktionelles *htrA*-Gen unerlässlich (Chatfield et al., 1992) (Baumler et al., 1994) (Johnson et al., 1991). Noch nicht geklärt ist die Bedeutung von HtrA für die Virulenz vieler Organismen. Die Ausschüttung von antimikrobiellen Substanzen des Wirts führt zu einer Akkumulation von denaturierten Proteinen im Periplasma des Bakteriums (Danese et al., 1998), die durch HtrA eliminiert werden könnten. Aber auch die mögliche Chaperonaktivität oder eine proteinprozessierende Funktion von HtrA könnten für die Faltung und den Export der Virulenzfaktoren notwendig sein.

HtrA und sein regulierendes Signaltransduktionssystem stellen deshalb einen vielversprechenden Angriffspunkt für die Bekämpfung vieler pathogener Mikroorganismen dar (Fabret und Hoch, 1998). Hierfür ist insbesondere der Einsatz von *htrA*-Stämmen als Vakzine gegen z. B. Tetanus (Roberts et al., 1998), Typhus (Levine et al., 1996) (Tacket et al., 1997), Herpes simplex (Chabalgoity et al., 1996) und Krankheiten (Loosmore et al., 1998), die durch *Haemophilus influenzae* ausgelöst werden, interessant.

Diagnose:

Die *htrA*-Gene von *Brucella spp.*, *Bartonella henselae* und *Helicobacter pylorii* sind bereits erfolgreich für diverse Diagnostiktests mittels Polymerase-Kettenreaktion verwendet worden (Da Costa et al., 1996) (Sander et al., 1999) (Clayton et al., 1993). Die Stämme von *H. pylorii* konnten aufgrund ihres Restriktionslängen-Polymorphismus des amplifizierten *htrA*-Gens differenziert werden.

Da nach einer Infektion das bakterielle HtrA im Serum von Menschen und Tieren nachgewiesen werden kann, ist es ein guter Kandidat für ein serodiagnostisches Zielprotein (Pallen und Wren, 1997).

2.6 Aufgabenstellung

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Faltung eines Haushaltsenzym *in vivo* und *in vitro* zu charakterisieren und die Unterschiede und Gemeinsamkeiten herauszuarbeiten.

Hierfür wurde die periplasmatische α -Amylase MalS aus *E. coli* ausgewählt. Nach der Reinigung von MalS sollten, für ein besseres Verständnis des Faltungsablaufs, zunächst die biochemischen Eigenschaften des Enzyms charakterisiert und eine Information über die Struktur und Organisation des Moleküls ermittelt werden. Ein zentraler Punkt war hierbei, die Bedeutung der Disulfidbrücken in MalS für die Faltung und Stabilität des nativen Proteins aufzuklären.

Durch die Konstruktion geeigneter Stämme sollte anschließend die Faltung von MalS *in vivo* studiert werden. Damit verbunden war die Identifizierung von Proteinen, die für eine Faltung der Amylase notwendig sind und auch der Protease, die für den Abbau von falsch gefaltetem MalS verantwortlich ist.

Die Konstruktion und Reinigung eines signalsequenzlosen MalS-Derivats sollte der Klärung von drei Fragen dienen: i) ist eine Faltung von MalS auch *in vitro* möglich, ii) von welchen Parametern hängt die Faltung *in vitro* ab und iii) welche Unterschiede und Gemeinsamkeiten bestehen bei der Proteinfaltung von MalS *in vivo* und *in vitro*?

Obwohl die Faltung von Proteinen und der Abbau von falsch gefalteten Proteinen *in vivo* konträre Abläufe sind, wurde für diese Prozesse für MalS nur ein Protein, die Protease DegP, identifiziert. Aufgrund dieses erstaunlichen Ergebnisses ist die Aufgabenstellung auf DegP erweitert worden, um zu verstehen, welche Mechanismen DegP ein bifunktionelles Handeln ermöglichen. Eine Struktur- und Funktionsanalyse von DegP sollte einer Charakterisierung der Domänen von DegP dienen und so ihren Beitrag für die einzelnen Aufgaben aufdecken. Durch eine Suche nach weiteren Substraten neben MalS sollte geklärt werden, ob DegP nur ein spezifisches Chaperon für MalS ist oder ob es sich um ein allgemeines periplasmatisches Chaperon handelt.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Abkürzungen

Neben den allgemeingebräuchlichen Abkürzungen, die den Empfehlungen der Nomenklaturkomitees bzw. denen der Herausgeber der Biochemischen Zeitschriften entsprechen, sind folgende Abkürzungen verwendet worden:

amp	Ampicillin
ara	Arabinose
AP	alkalische Phosphatase
BCIP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
CA	Casaminosäuren
cam	Chloramphenicol
DMF	N,N-Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTNB	Dithio-1,4-Nitrobenzoesäure (Ellmans Reagenz)
DTT	Dithiothreitol
DTE	Dithioerythritol
øP	Promotorfusion
FPLC	fast protein liquid chromatography
HPLC	high performance liquid chromatography
IA	Iodacetamid
IPTG	Isopropyl-β-D-Thiogalaktopyranosid
kan	Kanamycin
LB	Luria broth
M9	Minimalmedium 9
NBT	4-Nitro-Blau-Tetrazolium-Chlorid
ONPG	2-Nitrophenyl-β-D-Galactopyranosid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PEG	Polyethylenglycol
PG-6	p-Nitrophenyl-α-D-Maltohexosid
pNA	p-Nitroanilin
pNPP	p-Nitrophenyl-Phosphat
RT	Raumtemperatur
ss	Signalsequenz
Δss	deletierte Signalsequenz
TCA	Trichloressigsäure
tet	Tetracyclin
XG	Bromo-4-Chloro-3-Indolylβ-D-Galactopyranosid
XP	5-Bromo-4-Chloro-3-Indolylphosphat
wt	Wildtyp

3.2 Bezugsquellen der Chemikalien und Dienstleistungen

Enzyme:

Die Restriktionsenzyme wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), MBI Fermentas (St. Leon-Rot) und AGS (Heidelberg) bezogen.

Die β -Galaktosidase, das DsbA, die alkalische Phosphatase aus Kälberdarm und die Citrat Synthase wurden bei Roche Molecular Biochemicals (Mannheim), Lysozym bei Sigma (Deisenhofen) gekauft.

Die Taq-Polymerase und die Ligase wurden von Promega (Mannheim), die PfuTurbo-Polymerase von Stratagene (Amsterdam, Niederlande), die Vent-Polymerase von New England Biolabs erworben.

Enzymsubstrate und Inhibitoren:

Das MalS-Substrat PG-6 wurde von der Firma Fluka (Deisenhofen), das Resorfin-markierte Casein von Roche Molecular Biochemicals bezogen.

Die Peptidsubstrate stammen von Bachem (Heidelberg).

Der Inhibitor Acarbose wurde von Dr. E. Schneider, Institut für Biologie/Bakterienphysiologie der Humbolt-Universität zu Berlin, Berlin zur Verfügung gestellt.

Oligonukleotide:

Die Synthese der Oligonukleotide für PCR-Reaktionen wurde von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt.

Chemikalien:

Die für Puffer und Lösungen verwendeten Chemikalien, die nicht gesondert aufgeführt sind, stammen von den Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg) und Sigma. Die organischen Zusätze der Nährmedien sind von Difco (Heidelberg) bezogen worden.

Eichstandards:

Die Eichproteine für die Säulenchromatographie und die SDS-Gelelektrophorese stammen von Pharmacia (Freiburg), die Standards für DNA-Gele von New England Biolabs und MBI Fermentas.

Säulenmaterial:

Das Ni-NTA Superflow ist von der Firma Qiagen (Hilden), alle anderen Trennmatrizen sind von Pharmacia bezogen worden.

Der Mischbettionenaustauscher Serdolit MB stammt von Serva.

DNA-Sequenzierung:

Die DNA-Sequenzierungen sind durch die Firma GATC (Konstanz) ausgeführt worden.

3.3 Bakterienstämme und Plasmide

Die Charakteristika der verwendeten Bakterienstämme sind in der Tabelle 3-1 zusammengestellt.

Tab. 3-1. Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	relevanter Genotyp	Quelle
BB475	<i>araD139 flbB5301 ϕ[(malP,Q-lacZ)MudI(Ap,lac)] ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 zja-742::Tn10 Δ(argF-lac)U169 Δ(lac-argF) ΔmalE444</i>	1
BRE1162	MC4100 ϕ P[<i>malK-lacZ</i>]	1
BRE2000	MC4100 <i>tsx::Tn10</i>	1
CLC198	MC4100 <i>degP::Tn10</i>	2
CS6	CS10 <i>dsbA::kan</i>	3
CS10	<i>araD139 flbB5301 malQ malS ϕP[malP-lacZ] ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 Δ(argF-lac)U169malT^c dex7</i>	4
CS28	CS10 <i>degP::kan</i>	3
CS37	KS272 <i>malT::Tn10</i> gebochnert Δ <i>ara714 leu::Tn10</i> gebochnert <i>lamB</i> unabhängig	1
CS46	CS10 <i>xprA3::miniTn10kan</i>	3
CS49	CS6 <i>degP::Tn10</i>	3
CS50	PND2000 <i>dsbA::kan</i>	3
CS66	CS10 <i>malE::Tn10</i>	3
CS77	PND2000 <i>degP::Tn10</i>	3
CS78	CS50 <i>degP::Tn10</i>	3
CS79	PND2000 <i>zii::Tn10 cpxA9</i>	3
DHB4	F' <i>lacI^q pro Δ(ara-leu)7697 araD139ΔlacX74 galE galK rpsL phoR ΔphoA (PvuII) ΔmalF3 thi</i>	5
FA112	WP597 <i>gshA::kan</i>	17
FA113	WP597 <i>gor522.... Tn10</i>	17
GDR1	<i>his lacI::Tn10</i>	6
JCB572	JCB502 <i>dsbA::kan</i>	7
JP408	<i>araD139 deoC1 flbB5301 ptsF25 rbsR relA1 rpsL150 Δ(argF-lac)U169 F'pOXgen zii::Tn10 cpxA9</i>	16
KS272	MC4100 Δ (<i>ara-leu</i>)7697 Δ <i>lacYZI74 galE galK rpsL</i>	8
LMG190	MC4100 Δ <i>ara714 leu::Tn10</i>	9
MC4100	F' <i>araD139 Δ(araF-leu)U169 rpsL150 deoC1 relA1 ptsF25 flbB5301 rbsR</i>	10

Tab. 3-1 (Fortsetzung). Verwendete Bakterienstämme.

Stamm	relevanter Genotyp	Quelle
SF120	$\Delta lacX74 \Delta phoA (PvuII) galE kalK thi rpsL degP(\Delta PstI-KanR) ptr-32::camR \Delta ompT$	11
SB600	WG1 $\Delta fhuA \Delta hhoAB \Delta htrA$	15
STL117	$xprA3::miniTn10kan hisG4 argE3 leuB6 \Delta(gpt-proA)62 thr-1 thi-1 rpsL galK2 lacY 4xyl-5 mtl-1 kdgK51 supE44 tsx-33$	12
PND2000	MC4100 $\lambda RS88[degP-lacZ]$	13
WG1	Wildtyp	14
WP597	DHB4 $trxB::kan....Tn10$	17

1: Laborsammlung Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Konstanz; 2: Laborsammlung Department of Molecular Biology, Princeton University, New Jersey, USA; 3: diese Arbeit; 4: (Spiess et al., 1997); 5: (Boyd et al., 1987); 6: (Gottermann, 1997); 7: (Bardwell et al., 1991); 8: (Strauch und Beckwith, 1988); 9: (Wilcox et al., 1974); 10: (Casadaban, 1976); 11: (Banexy und Georgiou, 1991); 12: (Lovett und Kolodner, 1991); 13: (Danese et al., 1995); 14: Lederbergsammlung, CGSC #5073; 15: (Bass et al., 1996); 16: (Pogliano et al., 1997); 17: Fredrik Åslund, Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA.

Die in dieser Arbeit konstruierten und weitere eingesetzte Plasmide mit ihren Charakteristika sind in alphabetischer Reihenfolge in der Tabelle 3-2 zusammengefaßt.

Tab. 3-2. Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung/Genotyp	Resistenz	Quelle
pACYC184	Klonierungsvektor mit p15A Replikationsursprung	cam, tet	1
pAB6	pACYC184 mit $\Delta ssgP_{S210A}$ unter Kontrolle von P_{tac}	cam	2
pBAD18S	Expressionsvektor mit Promotor des Arabinoseoperons	amp	3
pBR322	Klonierungsvektor mit ColE1 Replikationsursprung	amp	4
pCS1	pBAD18S mit $\Delta ssmalS$	amp	5
pCS7	pCS1 nach Deletion eines Kpn I- Eco R I-Fragments	amp	5
pCS10	pACYC184 mit $degP_{S210A}$ unter Kontrolle von P_{tac}	cam	6
pCS13	pQE32 mit $\Delta ssmalS$	amp	6
pCS19	Expressionsvektor mit C-terminalem His-Tag und $lacI^q$ -Gen	amp	6

Tab. 3-2 (Fortsetzung). Verwendete Plasmide.

Plasmid	Beschreibung/Genotyp	Resistenz	Quelle
pCS20	pCS19 mit <i>degP</i>	amp	6
pCS21	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210A}	amp	6
pCS24	pCS19 mit <i>degP</i> _{E196K}	amp	6
pCS26	pCS19 mit <i>degP</i> _{V386A}	amp	6
pIC1	pCS19 mit <i>pdz</i> ₁₊₂	amp	6
pIW4	pCS19 mit <i>degP</i> _{ΔPDZ1,2}	amp	6
pIW5	pCS19 mit <i>degP</i> _{ΔPDZ2}	amp	6
pIW6	pCS19 mit <i>degP</i> _{ΔPDZ2}	amp	6
pIW7	pCS19 mit <i>degP</i> _{ΔPDZ1}	amp	6
pIW9	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210AΔPDZ1,2}	amp	6
pIW10	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210AΔPDZ2}	amp	6
pIW11	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210AΔPDZ2}	amp	6
pIW12	pCS19 mit <i>degP</i> _{S210AΔPDZ1}	amp	6
pMAL-p2	Proteinfusionsvektor mit <i>lacI</i> ^q -Gen	amp	7
pPW105	<i>degP</i> unter Kontrolle von P _{tac}	amp	8
pQE32	Expressionsvektor mit N-terminalem His-Tag	amp	9
pQE60	Expressionsvektor mit C-terminalem His-Tag	amp	9
pUMa103	<i>malS</i> unter Kontrolle seines eigenen Promotors	amp	10

1: (Chang und Cohen, 1978); 2: (Beil, 1999); 3: (Guzman et al., 1995); 4: (Bolivar et al., 1977); 5: (Prinz et al., 1996); 6: diese Arbeit; 7: New England Biolabs; 8: (Waller und Sauer, 1996); 9: Qiagen; 10: (Schneider et al., 1992).

3.4 Antiseren und Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antiseren und Antikörper sind in der Tabelle 3-3 zusammengefaßt. Bei allen Antiseren handelt es sich um Kaninchenserum.

Tab. 3-3. Verwendete Antikörper/Antiseren.

Antikörper/Antiserum	Spezifität	Referenz
α-DegP-MBP Antiserum	MBP, DegP, DegP-Derivate außer PDZ ₁₊₂	1
α-MalS-Antiserum	MalS	2
α-MBP-Antiserum	MBP, MalS	2
Ziege-α-Kaninchen IgG gekoppelt mit AP	sekundärer Antikörper bei Western-Transfers	3

1: Laborsammlung Department of Microbiology and Molecular Genetics, Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, USA; 2: Laborsammlung Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Konstanz; 3: Sigma.

3.5 Medien

Die Medien wurden nach Miller (Miller, 1972) hergestellt.

3.5.1 Flüssigmedien und Nährböden

Für die Herstellung der verschiedenen Flüssigmedien wurden die Substanzen eingewogen, mit vollentsalztem Wasser auf einen Liter aufgefüllt und autoklaviert. Für Agarplatten wurde dem entsprechenden Medium vor dem Autoklavieren 18 g Agar zugegeben.

LB-Medium:

Bacto Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g

NZA-Medium:

NZ-Amine	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	5,0 g

SOP-Medium:

Bacto Trypton	20,0 g
Hefeextrakt	10,0 g
NaCl	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
MgSO ₄ x 7 H ₂ O	1,0 g

Minimalmedium 9 (M9): 10 x Stammlösung

Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O	76,0 g
KH ₂ PO ₄	30,0 g
NaCl	5,0 g
NH ₄ Cl	10,0 g

Die 1 x Lösung des M9-Mediums ist folgendermaßen hergestellt worden: zu 900 ml autoklaviertem Wasser wurden in folgender Reihenfolge hinzugefügt: (1) 1 ml 1 M MgSO₄ (Endkonzentration 1 mM), (2) 100 µl 1 M CaCl₂ (Endkonzentration 0,1 mM) als sterile Lösungen und (3) 100 ml der 10 x M9-Stammlösung.

3.5.2 Medienzusätze

Sofern nicht anders angegeben, wurden die Medienzusätze in bidestilliertem Wasser gelöst und sterilisiert. Alle Zusätze sind als konzentrierte Stammlösungen angesetzt und erst nach dem Autoklavieren und Abkühlen der Medien auf mindestens 50 °C diesen zugefügt worden.

Tab. 3-4. Medienzusätze.

Substanz	Stammkonzentration	Endkonzentration
Ampicillin	100 mg/ml	200 µg/ml
Arabinose	1 M	1 mM
Casaminosäuren	20 % (w/v)	0,2 %
Chloramphenicol [°]	30 mg/ml	30 µg/ml
Glycerin	80 % (v/v)	0,2 %
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml
Maltose	20 % (w/v)	0,4 %
Natriumcitrat	1 M	20 mM
IPTG	1 M	1 µM - 1 mM
Tetracyclin [°]	5 mg/ml	5 µg/ml
Thiamin	4 % (w/v)	0,01 %
XG*	40 mg/ml	40 µg/ml

[°]: gelöst in 70 % Ethanol

*: gelöst in 100 % DMF

Die angegebenen Endkonzentrationen für die Antibiotika beziehen sich auf die Vollmedia LB und NZA. Bei M9-Medium wurden nur die halben Konzentrationen eingesetzt.

3.6 Mikrobiologische Methoden

3.6.1 Sterilisation

Die Medien und Lösungen wurden zur Sterilisation für 20 Minuten bei einem Druck von 1 bar und einer Temperatur von 120 °C autoklaviert. Die Sterilisation von hitzelabilen Lösungen erfolgte durch eine Filtration (FP 030/3, 0,2 µm; Schleicher und Schüll, Dassel). Glaswaren wurden für mindestens 8 Stunden bei 180 °C trocken sterilisiert.

3.6.2 Aufbewahrung von Stämmen

Die Aufbewahrung der verwendeten Bakterienstämme erfolgt als DMSO-Kultur bei -70 °C. Hierzu wurde einer LB-Übernachtskultur das DMSO zu einer Endkonzentration von 7 % (v/v) hinzugemischt und die Suspension direkt eingefroren.

3.6.3 Wachstumsbedingungen

Flüssigkulturen wurden in Gefäßen, die eine gute Belüftung zulassen, auf Schütteltischen, in Reagenzglasrollständern oder in Schüttelwasserbädern bei 37 °C inkubiert. PND2000 Stämme, deren weitere Konstrukte und Stämme mit Mutationen in Proteasen, wurden bei einer Temperatur von 28 °C inkubiert.

3.6.4 Bestimmung der Zelldichte in Flüssigkulturen

Die Zellzahl von Flüssigkulturen ist durch Messen der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 578$ nm (OD_{578}) im Eppendorf-Photometer bestimmt worden. Nach Miller (Miller, 1972) entspricht eine OD_{578} von 1 etwa 107 $\mu\text{g/ml}$ Protein. Die Zellzahl dieser optischen Dichte beträgt ungefähr 10^9 Zellen pro ml.

3.6.5 Arbeiten mit dem Bakteriophagen P1

3.6.5.1 Herstellung eines P1-Lysats

Eine Übernachtskultur, des für die Herstellung eines Lysats ausgesuchten Stammes, wurde 1:100 in 5 ml LB-Medium verdünnt und bis zu einer OD_{578} von 0,2 - 0,4 angezogen. Nach dem Erreichen der gewünschten Zelldichte, wurde der Kultur 20 μl 1 M CaCl_2 (Endkonzentration 5 mM) und 10 μl eines P1_{vir} -Lysats des Stammes MC4100 zugefügt, weiterhin bei der entsprechenden Temperatur inkubiert, bis die Lyse erfolgte. Dies ist am Aufklaren der Zellsuspension zu erkennen. Nach dem Zumischen von einigen Tropfen Chloroform wurden die Zelltrümmer abzentrifugiert (5', 4 000 x g, RT). Der gewonnene Überstand wurde in einem Glasgefäß mit Schraubverschluß bei 4 °C aufbewahrt.

3.6.5.2 P1-Transduktion

Die P1-Transduktionen verlief nach der Beschreibung von Silhavy (Silhavy et al., 1984). Die Kontrolle auf eine erfolgreiche Transduktion des gewünschten Genabschnitts erfolgte durch das Überprüfen der damit verbundenen phänotypischen Eigenschaft.

3.6.6 Konstruktion von Bakterienstämmen

Die in dieser Arbeit verwendeten *E. coli*-Stämme sind in der Tabelle 3-1 aufgeführt. Neue Stämme wurden durch eine P1-Transduktion wie folgt konstruiert:

CS6: Der Stamm entstand durch eine P1-Transduktion von CS10 mit einem P1-Lysat aus JCB572 (*dsbA::kan*) und anschließender Selektion auf die Kanamycin-Resistenz. Die Transduktanten wurden auf einen Faltungsdefekt von der alkalischen Phosphatase getestet.

CS28: Zur Konstruktion wurde der Stamm CS10 mit einem P1-Lysat von SF120 (*degP($\Delta\text{PstI-KanR}$)*) transduziert. Die Selektion erfolgte durch die Kanamycin-Resistenz. Die erhaltenen Transduktanten wurden auf ihre Hitzesensitivität bei 42 °C getestet.

CS46: Er wurde durch eine Transduktion eines P1-Lysates von STL117 (*xprA3::miniTn10kan*) in CS10 und eine anschließende Selektion auf die Kanamycin-Resistenz erhalten.

CS49: Durch die Transduktion eines P1-Lysates von CLC198 (*degP::Tn10*) in den Stamm CS6 (*dsbA::kan*) und der Selektion auf die Tetracyclin-Resistenz wurde dieser Stamm erhalten. Zur Überprüfung des Phänotyps diente die Hitzesensitivität bei 42 °C.

CS50: Der Stamm entstand durch eine P1-Transduktion von PND2000 mit einem P1-Lysat aus JCB572 (*dsbA::kan*) und Selektion auf Kanamycin-Resistenz. Die erfolgreiche Transduktion wurde durch eine erhöhte *degP-lacZ* Promotoraktivität überprüft.

CS66: Zur Konstruktion wurde der Stamm CS10 mit einem P1-Lysat aus BB475 (Δ *malE444 zja-742::Tn10*) transduziert. Die Transduktanten wurden auf die Tetracyclin-Resistenz selektiert und durch einen Western-Transfer mit α -MBP-Antiserum, das Ausschalten des *malE*-Gens nachgewiesen.

CS77 und CS78: Zur Konstruktion des Stammes CS77 bzw. CS78 wurde der Stamm PND2000 bzw. CS50 mit einem P1-Lysat von CLC198 (*degP::Tn10*) transduziert. Nach der Selektion auf die Tetracyclin-Resistenz fand die Überprüfung des Phänotyps durch die Hitzesensitivität bei 42 °C statt.

CS79: Dieser Stamm entstand durch eine P1-Transduktion von PND2000 mit einem P1-Lysat aus JP408 (*zii::Tn10 cpxA9*) und anschließender Selektion auf die Tetracyclin-Resistenz. Als Kontrolle für die erfolgreiche Transduktion diente die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität im Vergleich zum Ausgangsstamm PND2000.

3.7 Molekularbiologische Methoden

3.7.1 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA für die Restriktionsanalysen erfolgte durch den Qia-prep-Extraktionskit (Qiagen). Für die Klonierungen wurde die DNA über den Midi-Extraktionskit (Qiagen) isoliert.

3.7.2 Restriktionsverdau von Plasmid-DNA

Die Restriktionsverdau wurden zur Überprüfung der genotypischen Korrektheit von Plasmiden und zur DNA-Klonierung durchgeführt.

Die eingesetzte DNA-Menge betrug bei einfachen Überprüfungen 0,5 - 1 μ g, bei Klonierung 4 - 5 μ g. Zum Verdau wurden 3 - 5 Units des Restriktionsenzym pro μ g DNA eingesetzt. Das Endvolumen betrug 20 μ l für einfache Überprüfungen und 50 - 60 μ l bei Klonierungen.

Die Wahl des Restriktionspuffers und der Inkubationstemperatur für das verwendete Enzym richtete sich nach den Herstellerangaben. Die Inkubationsdauer betrug bei einfachen Überprüfungen eine Stunde. Für die Klonierungen erfolgte die Inkubation drei bis dreieinhalb Stunden. Nach dem Restriktionsverdau wurden die hitzeinaktivierbaren Restriktionsenzyme nach den Angaben des Herstellers inaktiviert.

Bei Klonierung eines Inserts in einen Vektor wurde, um eine Religation des Vektors auszuschließen, der Vektor dephosphoryliert. Hierzu wurde nach dem Restriktionsverdau dem Ansatz 4 Units alkalische Phosphatase aus Kälberdarm zugesetzt. Die Inkubation erfolgte für

30 Minuten bei 37 °C und bei glatten Enden zusätzlich für 30 Minuten bei 56 °C. Die Reaktion ist durch eine Zugabe von EDTA-Na₂, pH 8,0 zu einer Endkonzentration von 50 mM und 20minütiges Erhitzen auf 70 °C gestoppt worden.

3.7.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten für einige Klonierungen und zur genotypischen Überprüfung von Konstrukten angewendet. Als Polymerasen wurden die Tag-Polymerase, Vent-Polymerase und PfuTurbo-Polymerase eingesetzt.

Die Auswahl der Sequenz der bei der PCR verwendeten Oligonukleotide erfolgte mit der Hilfe des Computerprogramms 'Amplify v1.2'. Für Klonierungen wurden ausschließlich Oligonukleotide verwendet, die nach der Synthese über eine HPLC gereinigt waren.

Für die Ermittlung der Schmelztemperatur bei degenerierten Oligonukleotiden wurden nur die Basen berücksichtigt, die an die Matrizen-DNA anlagern. Die Berechnung der Schmelztemperatur (T_m) erfolgte über die Formel (1):

$$T_m = 69,3 \text{ °C} + 0,41 \times (\text{GC-Gehalt in \%}) - 650 / \text{Oligonukleotidlänge} \quad (1)$$

Als Anlagerungstemperatur wurden von der niedrigeren Schmelztemperatur der beiden Oligonukleotide zwei Grad Celsius abgezogen.

Die Elongationszeit der PCR-Produkte betrug für jeweils 1 000 Basen eine Minute. Es wurden immer 30 PCR-Zyklen durchgeführt.

Die PCR-Reaktionen fanden in 100 µl-Ansätzen statt und wurde mit dem GeneAmp9600-Gerät (Perkin Elmer, Überlingen) durchgeführt. Sie setzten sich wie folgt zusammen:

	µl
Matrizen DNA (Plasmid-*, chromosomale, Ganzzellen°)	1
Oligonukleotid 1 (100 pmol/µl)	1
Oligonukleotid 2 (100 pmol/µl)	1
Reaktionspuffer# (10 x)	10
DMSO*	10
MgCl ₂ ⁺ (25 mM)	10
H ₂ O _{bidest.}	ad 99
DNA-Polymerase	1

- : Die Plasmid-DNA einer Mini- oder Midi-Präparation wurde 1:20 verdünnt.
- : Eine Einzelkolonie wurde von der Platte mit einer sterilen Pipettenspitze abgekratzt und in 20 bis 100 µl bidestilliertem Wasser resuspendiert. Die PCR kann nur mit der Taq-Polymerase durchgeführt werden.
- #: Die Reaktionspuffer wurden von den Herstellern mitgeliefert.
- *: Das DMSO wurde nur den Ansätzen mit chromosomaler DNA beigemischt.
- +: Die Zugabe von MgCl₂ zum Ansatz erfolgte nur bei dem Einsatz von der Vent-Polymerase.

Wenn die amplifizierten DNA-Fragmente einer Klonierung dienen, wurde der Reaktionspuffer über den Qiaquick-PCR-Reinigungskit (Qiagen) entfernt und die DNA in den jeweiligen Restriktionspuffer umgepuffert. Nach dem Restriktionsverdau wurde das DNA-Fragment über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Kapitel 3.7.6 isoliert.

3.7.4 Ligierung von DNA-Fragmenten

Für die Ligierungen von dem Vektor und dem einzuklonierenden DNA-Fragment (Insert) sind zwei Methoden angewendet worden.

1. Ligierung von kompatiblen Enden bei Vektor und Insert:

Vektor bzw. Insert wurden nach der Elution aus einem Agarosegel in einem ungefähren Mengenverhältnis von 1:5 und 1:1 zu jeweils einem Reaktionsansatz mit sechs Weiss Units der T4 DNA Ligase und 2 µl 10-fach konzentriertem Ligationspuffer gegeben. Mit bidestilliertem Wasser wurde der Ansatz auf 20 µl eingestellt. Die Inkubation erfolgte in einem auf 16 °C (bei überhängenden Enden) bzw. 21 °C (bei glatten Enden) eingestellten Wasserbad über Nacht. Das Wasserbad befand sich in einer geschlossenen Styroporkiste, die im Kühlraum (4 °C) aufgestellt wurde. Dies führt zu einem langsamen Abfallen der Temperatur.

Am folgenden Tag wurde die Ligase durch ein Erhitzen (20', 70 °C) des Ansatzes inaktiviert. Vom Reaktionsansatz wurden für eine Elektrotransformation (Kapitel 3.7.7.2) kompetenter Zellen 2 µl eingesetzt.

Um sicherzugehen, daß eine Religation des Vektors auszuschließen war, wurde ein Ligationsansatz ohne das Insert durchgeführt. Nach der Transformation wurden dann, wie zu erwarten, keine oder nur wenige Transformanten erhalten.

2. Ligierung nicht kompatibler Enden bei Vektor und Insert:

Waren die zu ligierenden Enden von dem Vektor und Insert nicht kompatibel, so wurden überhängende 5'-Enden mit 10 Units der DNA-Polymerase I (großes Klenow Fragment) mit Desoxyribonukleotiden (je 0,25 mM) aufgefüllt. Die Inkubation erfolgte für 30 Minuten bei Raumtemperatur. Die Klenow-Polymerase wurde dann 20 Minuten bei 70 °C inaktiviert.

Die überhängenden 3'-Enden wurden mit der T4-Polymerase (6 Units pro Ansatz) abverdaut. Das Zurückschneiden erfolgte in einem auf 18 °C temperierten Wasserbad, das durch eine Zugabe von Eisstückchen innerhalb von 15 Minuten auf 12 °C abgekühlt wurde. Anschließend wurde die T4-Polymerase 20 Minuten bei 75 °C inaktiviert.

Nach dem Auffüllen oder dem Abverdauen des überhängenden Endes wurde die DNA über ein Agarosegel aufgetrennt und eluiert.

Ligationspuffer: 10 x Stammlösung

Tris/HCl, pH 8,0	300 mM
MgCl ₂	100 mM
DTT	100 mM
ATP	5 mM

3.7.5 Trennung von DNA-Fragmenten in Agarosegelen

Die Auftrennung der Plasmid-DNA nach den Restriktionsverdaus erfolgte in 0,7 bis 1,5 %-igen (w/v) Agarosegelen in TAE-Puffer bei einer konstanten Spannung von 80 V.

Die Anfärbung der DNA erfolgte im Ethidiumbromidbad (1 µg/ml in TAE-Puffer). Die Länge der DNA-Fragmente wurde durch einen Vergleich mit einem geeigneten Molekulargewichtsstandard (λ -DNA, *BstE* II verdaut oder 100 bp-Leiter) bestimmt.

TAE-Puffer: 50 x Stammlösung

Tris Base	2 M
EDTA-Na ₂	50 mM
Eisessig	6 % (v/v)

3.7.6 Isolierung von DNA-Fragmenten aus TAE-Agarosegelen

Nach dem Anfärben wurde das gewünschte DNA-Fragment aus dem Gel mit einem Skalpell ausgeschnitten und entsprechend der Herstellerangabe mit dem Qiaquick-Kit (Qiagen) aus dem Gelstück isoliert.

3.7.7 Herstellung kompetenter Zellen und Transformation

3.7.7.1 TSS-Transformation

Für Transformationen, die wie z. B. bei der Transformation eines gereinigten Plasmids keine hohe Effizienz erforderten, wurde die TSS-Transformation nach Chung et al. (Chung et al., 1989) durchgeführt. TSS bedeutet "transformation and storage solution".

Pro Ansatz wurden 50 µl Rezipientenzellen aus einer Kultur in der exponentiellen Wachstumsphase mit 50 µl 2 x TSS gemischt und für einige Minuten auf Eis gestellt. Die Zellen sind sofort kompetent. Die Transformation erfolgte durch die Zugabe von 1 - 2 µl Plasmid-DNA und einer Inkubation auf Eis für weitere 20 Minuten. Zur phänotypischen Expression wurde 1 ml LB-Medium hinzugefügt und der Ansatz eine Stunde bei 28 °C bzw. 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf einer Selektionsplatte ausplattiert und über Nacht bei der entsprechenden Temperatur bebrütet.

2 x TSS:

PEG-6000	20 % (w/v)
DMSO	10 % (v/v)
MgSO ₄	100 mM

Das PEG-6000 wurde in LB-Medium gelöst und anschließend autoklaviert. Das DMSO und sterilfiltrierte MgSO₄ wurden erst nach dem Autoklavieren hinzupipettiert. Die Lösung kann für mehrere Monate bei 4 °C aufbewahrt werden.

3.7.7.2 Elektrotransformation

Wenn eine hohe Transformationseffizienz erforderlich war, wie z. B. nach Ligationen, dann wurde die Methode der Elektrotransformation gewählt. Die Herstellung von kompetenten Zellen, sowie die Transformation wurden nach Sambrook et al. (Sambrook et al., 1989) durchgeführt.

3.7.8 Plasmidkonstruktionen

Die Tabelle 3-2 zeigt eine Übersicht der in dieser Arbeit konstruierten Plasmide.

3.7.8.1 Konstruktion von pCS10

Um eine Koexpression der Gene *degP*_{S210A} und *malS* in einem Stamm zu ermöglichen, mußte das *degP*_{S210A}-Gen aus pPW105 auf einen Vektor kloniert werden, der kompatibel zu dem Plasmid pUMa103 ist. Als Zielvektor wurde für das *degP*_{S210A}-Gen das Plasmid pACYC184 ausgewählt.

Durch einen Restriktionsverdau des Plasmids pACYC184 mit den Enzymen *Hind* III und *Bsa* I wurde ein Fragment erhalten, das ein Chloramphenicol-Resistenz-Gen und den Replikationsursprung p15A trägt. Das überhängende 5'-Ende des *Hind* III-Verdau wurde mit der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Um eine Religation des Fragmentes auszuschließen, wurden die Enden dephosphoryliert.

Das *degP*_{S210A}-Gen entstammt dem Plasmid pPW105. Es wurde mit den Enzymen *Sma* I und *Fau*ND I ausgeschnitten. Um glatte Enden zu erhalten, wurde das überhängende Ende mit der DNA-Polymerase I aufgefüllt.

Die beiden Fragmente wurden ligiert und in den Stamm CS37 transformiert. Die genotypische Korrektheit und die Orientierung des Inserts wurde durch einen *Eco*R I-Verdau des Plasmids überprüft.

3.7.8.2 Konstruktion von pCS13

Das Plasmid pCS13 wurde zur Reinigung von einem signalsequenzlosen MalS-Derivat aus dem Cytoplasma verwendet. Am 5'-Ende des *malS*-Gens kodiert dieser Vektor für einen „His-Tag“, der die Reinigung des Zielproteins (Δ ssMalS) erleichtert.

Als Zielvektor ist der N-terminale His-Tag-Vektor pQE32 ausgewählt worden. Dieser Vektor wurde durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Kpn* I und *Hind* III geöffnet. Um bei der Ligation eine mögliche Religation auszuschließen, wurde der Vektor dephosphoryliert. Das *malS*-Gen wurde aus dem Plasmid pCS1 ebenfalls durch einen Verdau mit den Enzymen *Kpn* I und *Hind* III ausgeschnitten, und konnte so direkt in den geöffneten Vektor pQE32 ligiert werden. Der Ligationsansatz wurde in den Stamm DHB4 transformiert. Die genotypische Korrektheit der erhaltenen Kandidaten wurde durch einen Restriktionsverdau mit den Enzymen *Kpn* I und *Hind* III bestätigt.

3.7.8.3 Konstruktion von pCS19

Die Konstruktion des Plasmids pCS19 dient der kontrollierten Expression von Proteinen mit einem C-terminalen His-Tag. Als Ausgangsplasmid dient hier der Vektor pQE60, einem

C-terminalen His-Tag-Vektor, von Qiagen. Die Expression des Zielgens ist unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotors. Da dem Vektor das Gen für den Lac-Repressor (*lacI*) fehlt, müßte bei der Verwendung dieses Vektors auf die Regulation der Transkription verzichtet werden. Um diesen Nachteil zu umgehen, wurde das *lacI^q*-Gen auf das Plasmid pQE60 kloniert, da eine Kopie des *lacI^q*-Gens (q steht für Quantität) auf einem F-Plasmid oder im Chromosom nur ungenügende Mengen an Repressor liefert. Das *lacI^q*-Gen hat einen mutierten Promotor, der eine starke Überexpression bewirkt.

Durch eine PCR wurde das *lacI^q*-Gen vom Plasmid pMAL-p2 amplifiziert. Für die PCR sind folgende Oligonukleotide verwendet worden:

LacIq.Ssp.Xba: 5'-CCAATATTCTAGATCATGCGCACCCGTG-3'

LacIq.Ssp.Xba: 5'-GGAATATTCTAGATTACCGTGCAGTCGATGATAAGC-3'

Diese Oligonukleotide führten am 5'- und 3'-Ende des *lacI^q*-Gens eine *Ssp* I- und *Xba* I-Schnittstelle ein. Das PCR-Produkt wurde mit *Xba* I geschnitten. Der Vektor pQE60 wurde ebenfalls durch *Xba* I geöffnet und die Enden dephosphoryliert. Die beiden Fragmente wurden ligiert.

Um die neuen Konstrukte vom religierten pQE60 zu unterscheiden, wurde die Ligation in den Stamm GDR1 transformiert. Dem Stamm GDR1 fehlt der LacI-Repressor aufgrund eines Transposons (*Tn10*) im *lacI*-Gen. Ansonsten ist das Lac-Operon komplett vorhanden. Die β -Galaktosidase wird deshalb in diesem Stamm konstitutiv exprimiert. Auf einer Agarplatte läßt sich die β -Galaktosidase-Aktivität durch Spaltung von ihrem Substrat XG, was eine tiefblaue Färbung der Kolonie verursacht, leicht nachweisen.

Erhalten Zellen nun ein Plasmid mit einem funktionellem *lacI*-Gen, ändert sich auf NZA-Platten, die XP enthalten, die Farbe von Blau nach Weiß. Aus den weißen Kolonien wurde das Plasmid präpariert und mit den Restriktionsenzymen *Xba* I und *Bgl* II auf genotypische Korrektheit überprüft. Die Orientierung des *lacI^q*-Gens wurde durch einen Doppelverdau mit den Enzymen *Nco* I und *Hpa* I bestimmt.

3.7.8.4 Konstruktion von pCS20

Um *degP* überzuexprimieren und das Genprodukt DegP leicht reinigen zu können, wurde das Plasmid pCS20 konstruiert. Durch dieses Konstrukt erhält man DegP mit einem C-terminalen His-Tag. An dem C-Terminus von DegP schließen sich die Aminosäuren Arginin, Serin und schließlich sechs Histidine an. Durch die Klonierung wurde die zweite Aminosäure des Vorläuferproteins von Lysin nach Alanin ausgetauscht.

Das *degP*-Gen wurde mittels einer PCR mit der Vent-Polymerase von einem Gemisch chromosomaler DNA der Stämme MC4100 und BRE2000 amplifiziert. Es sind folgende Oligonukleotide eingesetzt worden:

NcoI-degP: 5'-AAATCCATGGCGAAAACCACATTAGCACTG-3'

degP-BglIII: 5'-AACTAGATCTCTGCATTAACAGGTAGATGGTG-3'

Durch die PCR entstanden zur Subklonierung die Schnittstellen für *Nco* I (5'-Ende) und *Bgl* II (3'-Ende). Das erhaltene PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und

Bgl II geschnitten. Der mit *Nco* I und *Bgl* II geöffnete und dephosphorylierte Vektor pCS19 wurde mit dem PCR-Produkt ligiert. Die Transformation erfolgte in den Stamm SB600. Die erhaltenen Transformanten wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden „*Nco*I-degP“ und „degP-*Bgl*II“ auf das Vorhandensein des *degP*-Inserts getestet. Ein anschließender Verdau, der Plasmide von positiven Kandidaten, mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Bgl* II ergab die erwarteten Fragmentgrößen. Die Korrektheit des Konstrukts wurde durch eine Sequenzierung des *degP*-Gens verifiziert.

3.7.8.5 Konstruktion von pCS21

Zur Überexpression von *degP*_{S210A} wurde das Plasmid pCS21 konstruiert. Das Konstrukt entspricht dem Plasmid pCS20. Ein Unterschied zwischen den beiden Plasmiden besteht nur in einer Base. Deswegen wurde das exprimierte Protein DegP_{S210A} genannt.

Das *degP*_{S210A}-Gen wurde durch eine PCR mit der Taq-Polymerase vom Plasmid pCS10 amplifiziert. Bei der PCR sind die gleichen Oligonukleotide wie zur Konstruktion von pCS20 eingesetzt worden. Das PCR-Produkt wurde entsprechend dem Plasmid pCS20 modifiziert und subkloniert. Die Überprüfung der genotypischen Korrektheit wurde ebenfalls wie beim Plasmid pCS20 durchgeführt. Das Sequenzieren ergab, daß durch die PCR ein Basenaustausch stattgefunden hatte. Die Base 423 ist von Thymin nach Cytosin ausgetauscht worden. Für das Protein ergibt sich dennoch eine korrekte Aminosäuresequenz, da dies eine „stille“ Mutation ist.

3.7.8.6 Konstruktion von pCS24

Das Plasmid pCS24 wurde genau wie das Plasmid pCS20 konstruiert. Bei der Durchführung der PCR sind durch die Polymerase aber zufällig Mutationen eingeführt worden. Die Base 778 des Vektors wurde von Guanin nach Adenin ausgetauscht. Hierdurch ergibt sich eine Mutation, die zu einer veränderten Proteinsequenz führt. Im reifen Protein (DegP_{E196K}) ist die Aminosäure 196 von Glutaminsäure zu Lysin ausgetauscht.

3.7.8.7 Konstruktion von pCS26

Das Plasmid pCS26 ist ebenfalls durch einen zufälligen falschen Einbau bei der PCR entstanden. Die Konstruktion entspricht dem Plasmid pCS20. Durch die Mutation der Base 1349 von Thymin nach Cytosin kommt es zu einem Aminosäureaustausch. Das Valin 386 des reifen Proteins (DegP_{V386A}) ist gegen Alanin ausgetauscht.

3.7.8.8 Konstruktion von pIC1

Das Plasmid pIC1 kodiert für ein DegP-Derivat, dem die katalytische Domäne fehlt. Das exprimierte Protein wurde als PDZ₁₊₂ bezeichnet. Zur Konstruktion wurde mit der Vent-Polymerase eine PCR des Plasmids pCS20 durchgeführt. Als Oligonukleotide wurden Sequenzen ausgewählt, die am 5'- und 3'-Ende des Genabschnitts der katalytische Domäne an

lagern. Durch die Oligonukleotide wurden an den Enden des PCR-Produkts *Sac* I-Schnittstellen eingeführt. Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet:

5'-PDZ's: 5'-AATTGAGCTCCTGACCTCGCAGATGGTGGGAATACG-3'
3'-ss: 5'-AATTGAGCTCAGTCTCAGCCGCCGTTGCAGAGAGC-3'

Das PCR-Produkt wurde mit *Sac* I geschnitten und ligiert. Die Transformation erfolgte in den Stamm DHB4. Die genotypische Korrektheit der Transformanten wurde durch einen *Nco* I/*Hind* III-Doppelverdau überprüft. Eine Sequenzierung des Konstrukts erfolgte nicht.

3.7.8.9 Konstruktion von pIW4

Das Plasmid pIW4 enthält ein *degP*-Gen, dessen PDZ-Domänen deletiert sind. Das exprimierte Genprodukt wurde deshalb DegP_{ΔPDZ1,2} genannt. Als Ausgangsplasmid für die Klonierung von pIW4 diente das Plasmid pCS20. Nach dem Aufschneiden des Plasmids mit den Restriktionsenzymen *Bsm*F I und *Bgl* II wurden die überhängenden 5'-Enden mit der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Nach der Ligation wurde mit *Pst* I nachgeschnitten, um inkorrekte Ligationsereignisse zu eliminieren. Der Ligationsansatz wurde in den Stamm DHB4 transformiert.

Die genotypische Korrektheit des erhaltenen Konstrukts wurde durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Hind* III überprüft. Die erhaltenen DNA-Fragmente hatten die erwarteten Größen.

3.7.8.10 Konstruktion von pIW5

Das Plasmid pIW5 trägt ein *degP*-Gen, bei dem der für die PDZ2-Domäne kodierende Bereich deletiert wurde. Das Genprodukt wurde DegP_{ΔPDZ2} genannt.

Zur Konstruktion von pIW5 wurde das Plasmid pCS20 mit den Restriktionsenzymen *Pst* I und *Bgl* II geschnitten. Das überhängende 3'-Ende der *Pst* I-Schnittstelle wurde mit der T4-DNA Polymerase abverdaut und das überhängende 5'-Ende der *Bgl* II-Schnittstelle wurde mit der DNA-Polymerase I aufgefüllt. Der Ligationsansatz ist in den Stamm DHB4 transformiert und die genotypische Korrektheit von Transformanten über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Hind* III getestet worden.

3.7.8.11 Konstruktion von pIW6

Auch das Plasmid pIW6 trägt ein *degP*-Gen, dem die PDZ2-Domäne fehlt. Der Fusionspunkt ist aber im Vergleich zu pIW5 zum 5'-Ende hin verschoben.

Das Ausgangsplasmid pCS20 wurde mit den Restriktionsenzymen *Bsp*M I und *Bgl* II verdaut. Die überhängenden 5'-Enden sind mit der DNA-Polymerase I aufgefüllt worden. Nach der Religation des Vektors wurde mit dem Restriktionsenzym *Pst* I nachgeschnitten, um falsche Konstrukte zu eliminieren. Die Transformation erfolgte in den Stamm DHB4 und das erhaltene Konstrukt ist genotypisch durch einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *Nco* I und *Hind* III getestet worden.

3.7.8.12 Konstruktion von pIW7

Auf dem Plasmid pIW7 befindet sich ein *degP*-Gen mit fehlender PDZ1-Domäne, weshalb das exprimierte Protein DegP $_{\Delta PDZ1}$ genannt wurde. Zur Konstruktion dieses Plasmids ist zunächst über eine PCR eine *Pst* I-Schnittstelle am 5'-Ende des kodierenden Bereichs der PDZ1-Domäne eingeführt worden. Hierfür wurde mit der PfuTurbo-Polymerase eine PCR des Plasmids pCS20 mit folgenden Oligonukleotiden gemacht:

degP-5' SacI: 5'-TCTGCCAGGAAGGTTCTCCGTTCC-3'

Δ PDZ1-PstI: 5'-CTCTGCTGCAGCTGCGAGGTCAGGTTTTTC-3'

Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *Sac* I und *Pst* I verdaut und anschließend in den mit den selben Enzymen geöffneten Vektor pCS20 inkloniert worden. Der Ligationsansatz wurde in den Stamm DHB4 transformiert. Die genotypische Korrektheit der Transformanten wurde durch einen *Nco* I/*Hind* III-Doppelverdau überprüft. Eine Sequenzierung erfolgte nicht.

3.7.8.13 Konstruktion von pIW9

Das Plasmid pIW9 wurde entsprechend dem Plasmid pIW4 konstruiert. Als Ausgangsplasmid diente aber pCS21 anstelle von pCS20.

3.7.8.14 Konstruktion von pIW10

Das Plasmid pIW10 wurde genauso wie das Plasmid pIW5 konstruiert, wobei hier pCS21 als Ausgangsplasmid diente.

3.7.8.15 Konstruktion von pIW11

Die Klonierung des Plasmid pIW11 entspricht der des Plasmids pIW6. Anstelle des Ausgangsplasmids pCS20 wurde hierfür pCS21 verwendet.

3.7.8.16 Konstruktion von pIW12

Für die Konstruktion von pIW12 wurde wie bei dem Plasmid pIW7 verfahren. Als Matrizen-DNA für die PCR wurde anstelle des Plasmids pCS20 das Plasmid pCS21 verwendet. Das PCR-Produkt wurde in den Vektor pCS21 inkloniert.

3.8 Biochemische Methoden

3.8.1 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die SDS-Gelelektrophorese ist eine Mini-Protean II Apparatur (BioRad, München) verwendet worden. Im wesentlichen wurde nach der von Laemmli beschriebenen Methode verfahren (Laemmli, 1970). Die verwendeten Proben mit Ganzzellproteinen wurden aus Übernachtskulturen hergestellt, die unter reduzierenden Bedingungen in Probenpuffer mit 30 mM DTT, oder unter nicht-reduzierenden Bedingungen in Probenpuffer mit 20 mM Io-

dacetamid aufgenommen worden waren. Hierfür wurden 50 µl Zellsuspension mit 30 µl des jeweiligen Probenpuffers gemischt. Die chromosomale DNA ist durch ein Scheren zerstört worden.

Vor dem Auftragen auf das Gel wurden die Proben für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und danach abzentrifugiert (1', 20 000 x g, RT). Vom Überstand sind in der Regel 10 - 20 µl aufgetragen worden. Bei Proteinlösungen, die eine zu geringe Protein-Konzentration für eine SDS-PAGE hatten, wurde durch eine Methanol- (Wessel und Flügge, 1984) oder TCA-Fällung das Protein aufkonzentriert. Für eine TCA-Fällung ist eine 40 %-ige (w/v) wäßrige TCA-Lösung der Proteinlösung zu einer Endkonzentration von 13 % zugesetzt, die Probe für 20 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend abzentrifugiert (5', 17 000 x g, 4 °C) worden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 1 ml Aceton gewaschen. Nach dem Trocknen des Pellets wurde das Protein in 10 µl des entsprechenden Probenpuffers aufgenommen und auf ein SDS-Gel geladen worden. Die Auftrennung erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in einem 10 %-igen Gel.

3.8.2 Färben von SDS-Gelen

SDS-Gele wurden zum Nachweis der Proteine mit Coomassie gefärbt. Hierbei kamen zwei unterschiedliche Färbemethoden zur Anwendung, die sich jedoch nicht in ihrer Sensitivität, sondern in der Färbezeit unterscheiden. Die Nachweisgrenze bei beiden Methoden beträgt 30 bis 50 ng Protein.

3.8.2.1 Coomassie-Färbung nach Fairbanks

Diese Färbemethode besticht durch ihre Geschwindigkeit. Die Originalvorschrift (Fairbanks et al., 1971) wurde wie folgt modifiziert:

Nach Abschluß der Elektrophorese wurden die Gele zuerst für zwei Minuten in der Lösung A in der Mikrowelle aufgeköcht, fünf Minuten leicht geschüttelt und schließlich jeweils in der Lösung B und Lösung C kurz aufgeköcht. Die vollständige Entfärbung des Hintergrundes erfolgte durch ein Schütteln in der Lösung D bei Raumtemperatur.

Lösungen:

- A: 25 % Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,05 % (w/v) Coomassie Blau R-250
- B: 10 % Isopropanol, 10 % (v/v) Essigsäure, 0,005 % (w/v) Coomassie Blau R-250
- C: 10 % (v/v) Essigsäure, 0,002 % (w/v) Coomassie Blau R-250
- D: 10 % (v/v) Essigsäure

3.8.2.2 Coomassie-Färbung nach Neuhoff

Die Färbung nach Neuhoff et al. (Neuhoff et al., 1988) ist leicht verändert folgendermaßen durchgeführt worden:

Die Gele wurden für 10 Minuten in Trichloressigsäure (TCA) fixiert. Anschließend erfolgte die Behandlung in der Färbelösung über Nacht bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch. Die Färbelösung wurde kurz vor dem Gebrauch aus 40 ml Stammlösung A, 1 ml

Stammlösung B und 10 ml Methanol hergestellt. Die Entfärbung der Gele erfolgte durch ein Waschen in bidestilliertem Wasser.

Lösungen:

TCA:

TCA	12 % (w/v)
-----	------------

Stammlösung A:

NH ₄ SO ₄	10 % (w/v)
H ₃ PO ₄	2 % (w/v)

Stammlösung B:

Coomassie Brilliant Blau G-250	5 % (w/v)
--------------------------------	-----------

3.8.2 Western Immunoblotanalyse

Für einen spezifischen immunologischen Nachweis wurden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine PVDF- (Polyvinylidene Difluorid) Membran (Fluorotrans Transfer Membran 0,2 µm; Pall, Roßdorf) übertragen. Der Transfer erfolgte für eine Stunde bei einer Spannung von 100 V mit einer Mini Trans-Blot Transfer Zelle (BioRad). Nach dem Transfer wurde die Membran für eine Stunde in der Blockierlösung auf dem Schütteltisch inkubiert. Dann erfolgte die Inkubation für eine Stunde mit dem primären Antiserum (1:20 000 in TBST-Puffer). Zum Entfernen des ungebundenen Antiserums wurde die Membran dreimal für fünf Minuten mit dem TBST-Puffer gewaschen. Der Nachweis erfolgte mittels des mit AP-gekoppelten sekundären Antikörpers. Die Membran ist für 30 Minuten mit dem Konjugat (1:20 000 in TBST-Puffer) inkubiert worden. Es folgten zwei Waschschriffe im TBST-Puffer und eine Äquibrierung im AP-Puffer für jeweils fünf Minuten. Als Substrat für die alkalische Phosphatase wurde eine Lösung aus BCIP und NBT verwendet. Die Entwicklung wurde durch ein kurzes Waschen mit bidestilliertem Wasser und anschließender einstündiger Inkubation mit 50 mM EDTA-Na₂, pH 8,0 gestoppt. Als Größenstandard wurde der „low range prestained-marker“ (BioRad) verwendet.

Transferpuffer:

Tris Base	15 mM
Glycin	120 mM
SDS	10 mM
Methanol	20 % (v/v)

TBST-Puffer:

Tris/HCl, pH 7,5	20 mM
NaCl	150 mM
Tween-20	0,05 % (v/v)

Blockierlösung:

2 % (w/v) BSA (Fraktion V, Sigma) in TBST gelöst.

AP-Puffer:

Tris/HCl, pH 9,5	100 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	0,05 % (v/v)

Färbelösung:

AP-Puffer	10 ml
NBT	66 µl
(50 mg/ml in 70 % DMF)	
BCIP	33 µl
(50 mg/ml in DMF)	

3.8.3 Bestimmungen enzymatischer Aktivitäten**3.8.3.1 Citrat Synthase**

Eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität der Citrat Synthase erfolgte im Rahmen der Rückfaltungsstudien im Wesentlichen nach der von Srere et al. (Srere et al., 1963) beschriebenen Methode. Der Test basiert auf dem ersten Schritt des Citronensäurezyklus, in dem die Citrat Synthase eine Kondensation von Oxalessigsäure und Acetyl-Coenzym A zu Citrat und Coenzym A katalysiert. Das Seitenprodukt Coenzym A reduziert stöchiometrisch das Ellmans Reagenz (DTNB), was durch einem Anstieg der Absorption bei $\lambda = 405$ nm photometrisch verfolgt werden kann.

Es wurde ein Mikrottest etabliert, der aus 195 µl Reaktionspuffer und 5 µl Rückfaltungsansatz (Kapitel 3.8.7.2) besteht. Die Messung dieser Ansätze erfolgte in einem Mikrotiterplatten Lesegerät (Anthos HTII; Anthos, Krefeld). Die Änderung der Absorption wurde über einen Zeitraum von viereinhalb Minuten bei 25 °C verfolgt (40 Messpunkte). Der lineare Abschnitt der Absorptionzunahme wurde zur Bestimmung der spezifischen Aktivität der Citrat Synthase herangezogen. Sie berechnet sich nach der Formel (2):

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta\text{OD}_{405}}{\varepsilon \times d} \times V \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right) \quad (2)$$

ΔOD_{405} : Änderung der Absorption bei $\lambda = 405$ nm über den Zeitraum t (in min)

ε : molarer Extinktionskoeffizient von DTNB ($13\,600\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d : Schichtdicke des Messansatzes (0,55 cm)

V : Volumen des Messansatzes (2×10^{-4} l)

P_m : Proteinmenge im Messansatz ($3,6 \times 10^{-5}$ mg)

Reaktionspuffer:

TE-Puffer 50 mM Tris/HCl, 2 mM EDTA- Na_2 , pH 8,0	9,3 ml
10 mM Oxalessigsäure in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0	0,1 ml
10 mM DTNB in TE-Puffer	0,1 ml
5 mM Acetyl-Coenzym A Trilithiumsalz gelöst in TE-Puffer	0,3 ml

3.8.3.2 β -Galaktosidase-Aktivität in Ganzzellen

Der β -Galaktosidase-Test in Ganzzellen wurde mit Änderungen nach Miller (Miller, 1972) durchgeführt.

Für die Bestimmung der Aktivität wurde eine LB-Vorkultur des entsprechenden Stammes 1:100 in M9-Medium mit 0,2 % Glycerin und 0,01 % Thiamin verdünnt und über Nacht bei 28 °C inkubiert. Diese Übernachtskultur wurde dann 1:25 in das gleiche Medium, jedoch mit 0,4 % Maltose supplementiert, überimpft. Nach dem Erreichen der frühen logarithmischen Wachstumsphase ist ein Aliquot zur Messung der β -Galaktosidase-Aktivität entnommen worden. Für den Enzymtest wurden 0,975 ml Z-Puffer mit 0,025 ml der Zellsuspension versetzt. Zum Aufschließen der Zellen wurden 25 μl einer 0,1 %-igen (w/v) SDS-Lösung und 25 μl Chloroform hinzupipettiert, 10 Sekunden gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Start der Enzymreaktion erfolgte durch eine Zugabe von 0,2 ml ONPG-Substrat (4 mg/ml in Z-Puffer). Die enzymatische Spaltung des Substrats führt zur Freisetzung von o-Nitrophenol, dessen Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm photometrisch bestimmt wurde. Nach der Gelbfärbung des Ansatzes wurde die Reaktion durch das Alkalisieren mit 0,5 ml 1 M Na_2CO_3 gestoppt. Es wurde abzentrifugiert (5', 20 000 x g, RT) und der Überstand im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm vermessen. Als Referenz für den Nullabgleich des Photometers diente ein Ansatz der 0,025 ml LB-Medium anstelle von 0,025 ml Zellsuspension enthielt. Die β -Galaktosidase-Aktivität errechnet sich nach der Formel (3):

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{OD}_{405} \times V_t}{\text{OD}_{578} \times G_p \times V_z \times t \times \epsilon} \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times 10^9 \text{ Zellen}} \right) \quad (3)$$

OD_{578} : optische Dichte der eingesetzten Zellsuspension

OD_{405} : optische Dichte der Enzymreaktion bei $\lambda = 405 \text{ nm}$

G_p : Gesamtproteinmenge einer Zellsuspension der $\text{OD}_{578} = 1$ (107 $\mu\text{g/ml}$)

V_t : Endvolumen des Ansatzes (1,7 ml)

V_z : Volumen der eingesetzten Zellsuspension (1 ml)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ (4 860 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

t : Zeit (in min) bis zum Abstoppen der Enzymreaktion

Z-Puffer:

Na_2HPO_4	60 mM
NaH_2PO_4	40 mM
KCl	10 mM
MgSO_4	1 mM

3.8.3.3 Aktivität von reiner β -Galaktosidase

Die Aktivität von reiner β -Galaktosidase wurde im Rahmen von den Rückfaltungsexperimenten durchgeführt. Die Bestimmung erfolgte mit einer β -Galaktosidase-Konzentration von 0,01 mg/ml. Als Puffersystem wurde der R-Puffer (Kapitel 3.8.7.3) gewählt.

Da die Absorption im Mikrotiterplatten-Lesegerät (Anthos HTII) ermittelt wurde, konnte die Aktivitätsbestimmung in einem kleinen Volumen erfolgen. Es wurden 180 μl der Enzymlösung zu 20 μl ONPG-Substrat (4 mg/ml in Z-Puffer) pipettiert, wodurch die enzymatische Reaktion gestartet wurde. Die Absorption wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ bestimmt. Anhand der Steigung der Absorptionszunahme in Abhängigkeit der Reaktionszeit ließ sich die spezifische β -Galaktosidase-Aktivität nach der Formel (4) errechnen:

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{\Delta\text{OD}_{405}}{\epsilon \times d} \times V \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right) \quad (4)$$

ΔOD_{405} : Änderung der Absorption bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ über den Zeitraum t (in min)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von o-Nitrophenol (4 860 $\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d : Schichtdicke des Messansatzes (0,55 cm)

V : Volumen des Messansatzes ($2 \times 10^{-4} \text{ l}$)

P_m : Proteinmenge im Messansatz ($2 \times 10^{-3} \text{ mg}$)

3.8.3.4 MalS-Aktivität in Zellen

Der Enzymtest wurde mit Änderungen nach Freundlieb und Boos (Freundlieb und Boos, 1986) durchgeführt.

Für eine Übernachtskultur ist eine LB-Vorkultur 1:100 in M9-Medium, das mit 0,2 % Casamino-säuren supplementiert war, verdünnt worden. Bei den Stämmen, die nicht den Genotyp *malT^C* hatten, wurde die Expression von *malS* durch die Beigabe von 0,4 % Maltose induziert. Von dieser Übernachtskultur wurden 10 ml abzentrifugiert (5'; 4 000 x g), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet mit M9-Medium aufgenommen, wieder abzentrifugiert und so resuspendiert, daß eine optische Dichte bei $\lambda = 578$ nm von zwei erhalten wurde. Die Zellen, bei denen MalS im Cytoplasma lokalisiert ist, wurden zum Aufschluß mit 25 μ l einer 0,1 %-igen (w/v) SDS-Lösung und 25 μ l Chloroform versetzt, 10 Sekunden gemischt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei einer periplasmatischen Lokalisierung müssen die Zellen nicht aufgeschlossen werden, da das Substrat PG-6 durch die Pore LamB eindiffundiert. Die enzymatische Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 μ l 200 mM PG-6 (Endkonzentration 2 mM) gestartet.

Nach dem Eintreten einer Gelbfärbung, die durch die enzymatische Abspaltung der terminalen Nitrophenylgruppe des Substrates PG-6 entsteht, wurde die Reaktion durch eine Zugabe von 170 μ l der TCA-Lösung gestoppt. Aufgrund der starken Ansäuerung verschwindet die Gelbfärbung. Der Ansatz wurde gemischt, 15 Minuten auf Eis inkubiert und abzentrifugiert (5', 20 000 x g, RT), um die Zelltrümmer zu entfernen. Vom Überstand wurden 400 μ l in ein neues Reaktionsgefäß überführt und kurz vor der Messung dem Ansatz 600 μ l Na₂CO₃-Lösung zugefügt. Der pH-Wert stieg dadurch auf pH 12,5 und die Gelbfärbung wurde zurückgewonnen. Zur Ermittlung der Umsatzrate wurde in diesem Ansatz die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm photometrisch bestimmt. Die Aktivität von MalS ergibt sich aus Formel (5):

$$\text{Aktivität} = \frac{c \times V}{t \times f_z} \times f_i \times f_n \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times 10^9 \text{ Zellen}} \right) \quad (5)$$

f_z : Faktor zur Normierung auf 10⁹ Zellen pro Ansatz (OD₅₇₈ = 1 entspricht 10⁹ Zellen/ml; bei der eingesetzten OD₅₇₈ = 2 ist der Faktor in einem 500 μ l Ansatz folglich 1)

f_i : Verdünnungsfaktor aufgrund der TCA-Fällung (1,34)

f_n : Verdünnungsfaktor aufgrund der Na₂CO₃ Zugabe (2,5)

t : Zeit (in min) bis zum Abstoppen des Ansatzes

V : Volumen (in ml) des Versuchsansatzes (0,500 ml)

c : Konzentration von Nitrophenol in der Küvette; über das Lambert-Beer'sche Gesetz aus der Absorption bei $\lambda = 405$ nm berechenbar: $c = A/\epsilon \times d$ ($\epsilon = 1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

Lösungen:

TCA	20 % (w/v)
Na ₂ CO ₃	2 M
PG-6	200 mM in H ₂ O _{bidest}

3.8.3.5 Enzymatische Aktivität von gereinigtem MalS

Die Aktivität von gereinigtem MalS wurde im TC-Puffer bestimmt. Die Enzymreaktion fand in einem Gesamtvolumen von 125 µl bei Raumtemperatur mit einer MalS-Endkonzentration von 1,16 µg/ml (15,7 nM) statt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe des Substrats PG-6 (Endkonzentration von 1 mM) gestartet. Um den Effekt verschiedener Substanzen auf die enzymatische Aktivität von MalS zu studieren, fand eine Vorinkubation mit der jeweiligen Chemikalie mit MalS für fünf Minuten vor der Zugabe des Substrats statt. Nach dem Auftreten einer Gelbfärbung wurde die Absorption bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm in einem Mikrotiterplattenlesegerät (Anthos HTII) bestimmt.

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von MalS wurde das Enzym in einer Proteinkonzentration von 1,45 µg/ml eingesetzt. Die Substratkonzentrationen hierfür lagen zwischen 0,5 und 500 µM. Alle Tests wurden mindestens zweimal unabhängig voneinander durchgeführt. Die spezifische MalS-Aktivität ergibt sich aus der Formel (6):

$$\text{spezifische Aktivität} = \frac{OD_{405} \times V \times 10^6}{\epsilon \times d \times t \times P_m} \left(\frac{\text{nmol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right) \quad (6)$$

OD₄₀₅: Absorption des Ansatzes bei $\lambda = 405$ nm

V: Volumen des Messansatzes (in µl)

ϵ : Extinktionskoeffizient von p-Nitrophenol ($1,8 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d: Schichtdicke des Messansatzes (in cm)

t: Reaktionszeit (in min)

P_m: Eingesetzte MalS-Menge (in µg)

Lösungen:

TC-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM CaCl ₂
PG-6	200 mM in H ₂ O _{bidest}

3.8.3.6 Enzymatische Aktivität von gereinigtem DegP und DegP-Derivaten durch Resorufin-markiertes Casein

Casein kann als Substrat für die Bestimmung der Proteaseaktivität von DegP und seinen Derivaten verwendet werden. Um die proteolytische Aktivität photometrisch analysieren zu können verwendet man Casein, das mit Resorufin markiert ist. Als Maß für die Proteaseaktivität dienen die Caseinfragmente, die durch TCA nicht fällbar sind. Der Test wurde wie folgt durchgeführt:

Im Ansatz lag eine Proteinmenge von 5 µg DegP vor. Bei Derivaten, die geringere Aktivität aufwiesen, wurde entsprechend mehr Protein eingesetzt. Die DegP Lösung wurde mit 50 µl Substratlösung versetzt und mit dem Inkubationspuffer auf 200 µl aufgefüllt. Als Referenz diente eine Mischung aus 50 µl Substratlösung und 150 µl Inkubationspuffer. Die Inkubation erfolgte über Nacht im Dunkeln bei 37 °C und wurde dann durch das Zumischen von 480 µl Stopplösung beendet. Dies führt bei Raumtemperatur innerhalb von 10 Minuten zum Fällen des ungespaltenen Caseins. Nach dem Abzentrifugieren (5', 20 000 x g, RT) wurden 400 µl Überstand abgenommen und mit 600 µl Testpuffer gemischt. Zur Berechnung der proteolytischen Aktivität von DegP wurde die Absorption im Photometer bei einer Wellenlänge von $\lambda = 574$ nm bestimmt und nach der Formel (7) berechnet.

$$\text{Aktivität} = \frac{\text{OD}_{574} \times V \times V_F}{\varepsilon \times d \times t \times P_m} \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right) \quad (7)$$

OD_{574} : Absorption bei $\lambda = 574$ nm

ε : molarer Extinktionskoeffizient von Resorufin ($66\,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d : Schichtdicke der Küvette (in cm)

V : Volumen des Messansatzes (1×10^{-3} l)

t : Zeitraum der Reaktion (in min)

P_m : Proteinmenge im Messansatz (in mg)

V_F : Verdünnungsfaktor durch Zugabe von Stopp- und Testreagenz (5)

Lösungen:

Substratlösung	4 mg/ml Casein-Resorufin markiert in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
Inkubationspuffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0
Stopplösung	6 % (w/v) Trichloressigsäure in $\text{H}_2\text{O}_{\text{bidest}}$
Testpuffer	0,5 M Tris/HCl, pH 8,0

3.8.3.7 Spaltung von kurzkettigen pNA-Peptiden durch DegP

Die proteolytische Aktivität von Proteasen kann durch Peptide, die eine C-terminal gekoppelte p-Nitroanilin-Gruppe (pNA) tragen, bestimmt werden. Die Spaltung muß hierfür zwischen der p-Nitroanilin-Gruppe und der damit verknüpften Aminosäure erfolgen. Die Menge des freigesetzten p-Nitroanilin ist ein Maß für die Proteaseaktivität und kann photometrisch quantifiziert werden. Die für eine Bestimmung der proteolytischen Aktivität von DegP verwendeten pNA-Peptide sind in der Tabelle 3-5 aufgeführt.

Tab. 3-5. pNA-Peptide zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP.

Peptid	Molekulargewicht (in Da)	Lösungsmittel
Suc-AAPV-pNA	576,6	Methanol
Suc-AAV-pNA	479,5	DMF

Die Peptide wurden in einer Endkonzentration von 100 μ M verwendet. Für den Test wurden 15 μ g gereinigtes DegP in 495 μ l T-Puffer eingesetzt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 5 μ l des Substrats gestartet, der Ansatz bei der entsprechenden Temperatur inkubiert und nach 20 Stunden durch eine Zugabe von 500 μ l Citronensäure gestoppt. Die Absorption des Ansatzes wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405$ nm bestimmt. Die spezifische proteolytische Aktivität von DegP ergibt sich dann aus der Formel (8):

$$\text{Aktivität} = \frac{\Delta\text{OD}_{405} \times V}{c \times \epsilon} \left(\frac{\text{mol}}{\text{min} \times \text{mg}} \right) \quad (8)$$

ΔOD_{405} : Absorptionssänderung bei $\lambda = 405$ nm über den Zeitraum t (in min)

V : Endvolumen des Reaktionsansatzes (in ml)

c : Konzentration von DegP im Reaktionsansatz (in mg/ml)

ϵ : molarer Extinktionskoeffizient von pNA (8 800 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)

Lösungen:

T-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,7
Citronensäure	1 M
Peptide (Tab. 3-5)	100 mM

3.8.3.8 Spaltung von langkettigen Peptiden durch DegP

Eine Spaltung der in Tabelle 3-6 aufgeführten Peptide durch DegP sollte durch eine Chromatographie nachgewiesen werden.

Tab. 3-6. Peptide zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP.

Peptidname	Peptidsequenz	Molekulargewicht (in Da)
MalF	MDVIKKKHWWQSDALKWSVLGLLGLLVGYLVV	3 696
TEV-site	CLTLIHKFENLYFQSAAAILVYKSQ	2 902

Der Proteolyseansatz bestand aus 90 µl T-Puffer mit 15 µg DegP und 10 µl Peptid. Als Referenz wurde ein entsprechender Ansatz gewählt, der anstelle von DegP das Protein DegP_{S210A} enthielt. Nach der Inkubation (17 h, 37 °C) wurde das Protein durch einen Mikrokonzentratoren (Microcon; Amicon, Witten) mit einer Ausschlußgrenze von 10 kDa abgetrennt (20', 4 650 x g, RT).

Die Auftrennung möglicher Spaltprodukte erfolgte durch eine Superdex Peptide HR 10/30 Säule (Pharmacia) mit Acetonitril als Laufmittel (Flußrate: 0,5 ml/min), ihr Nachweis mittels eines Spektralphotometers bei einer Wellenlänge von $\lambda = 280$ nm.

Lösungen:

T-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0
Peptid	2 mM in Methanol

3.8.4 Proteinreinigung

Zur Reinigung von Proteinen wurde eine automatisierte FPLC-Anlage von Pharmacia oder die BioLogic Workstation (BioRad) verwendet. Als Leersäule zum Packen von Ni-NTA Superflow- und Q-Sepharose-Material wurde eine VantagL-Laborsäule VL 11 x 250 (Millipore, Neu-Isenburg) verwendet.

3.8.4.1 Reinigung von MalS

Die periplasmatische Amylase MalS wurde aus dem Stamm CS66 gereinigt. In dem Stamm ist das *malE*-Gen, das für das Maltosebindeprotein (MBP) kodiert, ausgeschaltet. Dadurch wird eine Koreinigung von MBP und MalS vermieden. Die Überexpression von *malS* fand von dem Plasmid pUMa103 statt. Die Reinigung besteht deshalb lediglich aus zwei Schritten, einem kalten osmotischen Schock und einer anschließenden Anionenaustauschchromatographie.

Eine ausgewachsene Vorkultur in LB-Medium wurde 1:100 in fünf Liter Minimalmedium (M9-Medium mit 0,2 % CA und 100 µg/ml Ampicillin) überimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet (10', 4 000 x g, RT). Alle folgenden Schritte der Aufreinigung wurden bei Raumtemperatur ausgeführt. Das Zellpellet wurde in 250 ml T-300-Puffer resuspendiert, abzentrifugiert (10', 4 000 x g), in 250 ml T-30-Puffer resuspendiert und nach einem erneuten Abzentrifugieren schließlich in 125 ml T-Puffer aufgenommen. Der Zentrifugenbecher wurde auf einen Magnetrührer gestellt und unter ständigem Rühren wurde langsam 125 ml Saccharose-Lösung zugegeben, 10 Minuten gerührt und abzentrifugiert (20', 13 200 x g). Der Überstand wurde abgegossen und die verbliebene Saccharose sorgfältig mit einem Zellstofftuch aus dem Zentrifugenbecher gewischt. Das Zellpellet wurde nun mit dem Magnetrührer über den Rand und Boden des Zentrifugenbechers verteilt. Der Zentrifugenbecher wurde in ein Eiswasserbad gestellt, das sich auf einem Magnetrührer befand. Die Zellen wurden mit 400 ml eiskalter Schocklösung resuspendiert und 10 Minuten kräftig gerührt. Nach der Zentrifugation (30', 13 200 x g, 4 °C) wurde der klare Überstand lyophilisiert. Das Lyophilisat wurde in 10 ml Puffer A gelöst. Unlösliche Bestandteile wurden durch eine Zentrifugation (20', 27 000 x g, 4 °C) abgetrennt und der Überstand gegen den

Puffer A dialysiert. Das Dialysat wurde über eine Mono Q HR 5/5-Säule (Pharmacia) weiter gereinigt. Als Auftrags- und Waschpuffer diente Puffer A und zur Elution Puffer B. Eine Elution von MalS von der Säule erfolgte mit einem linearen Gradienten über 50 ml von 100/0 - 80/20 % Puffer A/Puffer B. Die Elution von MalS bei ca. 8 % Puffer B entspricht 80 mM NaCl.

Die Reinheit der eluierten Fraktionen wurde durch eine Coomassiefärbung eines 10 %-igen SDS-Gels bestimmt. Die Fraktionen, die eine Reinheit von > 95 % aufwiesen, wurden vereint und für die weiteren Experimente eingesetzt. Die Gesamtproteinmenge an gereinigtem MalS betrug bei obigem Reinigungsansatz ungefähr 5 mg.

Das gereinigte Protein wurde im Kühlschrank aufbewahrt. Ein Aktivitätsverlust konnte auch nach monatelanger Lagerung nicht beobachtet werden.

Lösungen:

T-300	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 300 mM NaCl
T-30-Puffer	10 mM Tris/HCl, pH 7,5; 30 mM NaCl
T-Puffer	30 mM Tris/HCl, pH 7,5
Saccharose-Lösung	40 % (w/v) in 30 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 mM EDTA-Na ₂
Schocklösung	0,5 mM CaCl ₂
Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 7,5
Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 1 M NaCl

3.8.4.2 Reinigung von ΔssMalS

Das cytoplasmatisch lokalisierte Protein ΔssMalS wurde aus dem Stamm DHB4pCS13 gereinigt. Da bei starker Überexpression das Protein unlösliche Aggregate bildet, ist eine Reinigung von ΔssMalS nur unter denaturierenden Bedingungen möglich. Mit einer ausgewachsenen LB-Vorkultur des Stammes wurde ein Liter LB-Medium 1:50 angeimpft und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Die Expression des Proteins ΔssMalS war durch eine Zugabe von IPTG zu 1 mM induziert worden. Die Zellen wurden abzentrifugiert (10', 4 000 x g, 4 °C), in 60 ml Lysispuffer resuspendiert, durch die French Press (1 500 psi, 4 °C) zweimal aufgeschlossen, anschließend abzentrifugiert (30', 27 000 x g, 4 °C) und der Überstand verworfen. Alle weiteren Reinigungsschritte wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Pellet wurde in 6 ml Puffer B resuspendiert. Nach erneutem abzentrifugieren (20', 27 000 x g, RT) wurde der Überstand abgenommen und auf eine mit 5 ml Ni-NTA Superflow gefüllte Säule geladen (Flußrate: 1,5 ml/min). Das Säulenmaterial war zuvor mit Puffer B äquilibriert worden. Das Waschen erfolgte mit 200 ml Puffer C (Flußrate: 3 ml/min) bis kein ungebundenes Protein mehr nachgewiesen werden konnte. Die Elution des Proteins erfolgte mit Puffer E (Flußrate: 3 ml/min). Die Reinheit der Fraktionen wurde durch ein 10 %-iges SDS-Gel überprüft und betrug in allen Fraktionen > 95 %. Aus einem Liter Ausgangskultur konnten ungefähr 18 mg ΔssMalS gewonnen werden.

Die Lagerung des Proteins erfolgte im Kühlschrank. Auch nach mehrmonatiger Lagerung war das Protein stabil, jedoch war eine Rückfaltung nach diesem Zeitraum sehr ineffizient. Für die Rückfaltungsstudien wurde das Protein immer frisch gereinigt.

Lösungen:

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol
Puffer B	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris, pH 8,0; 8 M Harnstoff
Puffer C	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris, pH 6,3; 8 M Harnstoff
Puffer E	100 mM NaH ₂ PO ₄ ; 10 mM Tris, pH 4,5; 8 M Harnstoff

Vor der Herstellung der Puffer B, C und E wurde der Harnstoff gereinigt. Hierzu wurde Harnstoff für eine 8 M Lösung in Wasser eingewogen, das Volumen jedoch noch nicht vollständig eingestellt. Die Reinigung erfolgte durch die Zugabe des Mischbettionenaustauschers Serdolit MB (SERVA) unter ständigem Rühren für mindestens zwei Stunden. Das Serdolit MB wurde dann durch eine Papierfiltration abgetrennt. In die gereinigte Harnstofflösung sind die entsprechenden Salze eingewogen und auf den gewünschten pH-Wert mit H₃PO₄ oder NaOH eingestellt worden. Die Puffer müssen kurz vor ihrem Gebrauch angesetzt werden, da sich die pH-Werte durch den Harnstoff bei der Lagerung verändern.

3.8.4.3 Reinigung der Proteine DegP, DegP_{S210A}, DegP_{ΔPDZ1}, DegP_{ΔPDZ2} und PDZ₁₊₂

Die Proteine DegP, DegP_{S210A}, DegP_{E196K}, DegP_{ΔPDZ1}, DegP_{ΔPDZ2} und PDZ₁₊₂ wurden aus dem Stamm CLC198, der das entsprechende Plasmid pCS20, pCS21, pCS24, pIW7, pIW5 bzw. pIC1 enthält, gereinigt. Da der Stamm CLC198 kein funktionelles chromosomales *degP* trägt, ist auszuschließen, daß sich aufgrund des oligomeren Zustands von DegP und seinen Derivaten "gemischte Oligomere" bilden.

Die Aufzuchtbedingungen des jeweiligen Stammes und die Reinigungsschritte sind für alle Proteine identisch. 400 ml LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) wurden mit dem jeweiligen Stamm von einer Platte angeimpft. Nach ungefähr fünf Stunden Wachstum bei 28 °C wurde die Proteinexpression durch eine Zugabe von IPTG (10 µM Endkonzentration) induziert. Das weitere Wachstum erfolgte über Nacht bei 28 °C. Die Zellen wurden durch eine Zentrifugation (10', 4 000 x g, 4 °C) geerntet und in 25 ml Lysispuffer resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch zwei Durchgänge in der French Press (1 500 psi, 4 °C). Nach dem zweimaligem Abzentrifugieren der Zelltrümmer (20', 13 000 x g, 4 °C) wurde der Überstand auf eine Säule mit 3 ml Ni-NTA Superflow (Qiagen) geladen (Flußrate: 1,5 ml/min). Die Ni-NTA-Säule war zuvor mit Lysispuffer äquilibriert worden. Nichtbindende Proteine wurden mit 150 ml Waschpuffer eliminiert (Flußrate: 3 ml/min). Das gebundene Protein wurde mit Elutionspuffer abgelöst (Flußrate: 3 ml/min). Die Proteine DegP, DegP_{S210A} und DegP_{E196K} eluierten bei einer Imidazolkonzentration von 100 mM, die DegP-Derivate DegP_{ΔPDZ1} oder DegP_{ΔPDZ2} bei einer Imidazolkonzentration von 50 mM und das Protein PDZ₁₊₂ erst bei einer Imidazolkonzentration von 150 mM. Die Reinheit des eluierten Proteins ist durch ein SDS-Gel mit Coomassiefärbung ermittelt worden. In den Hauptfraktionen konnte eine Reinheit von > 95 % dokumentiert werden. Aus 400 ml Anfangskultur konnten bis zu 70 mg Protein gewonnen werden.

Die Lagerung der gereinigten Proteine erfolgte, aliquotiert, nach der Zugabe von Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % (v/v), bei -70 °C. Dabei konnte auch nach monatelanger Lagerung kein Aktivitätsverlust festgestellt werden.

Zur Verwendung wurde ein Aliquot bei Raumtemperatur aufgetaut und extensiv bei 4 °C gegen T-Puffer dialysiert.

Lösungen:

Lysispuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0; 300 mM NaCl; 10 mM Imidazol
Waschpuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0; 300 mM NaCl; 20 mM Imidazol
Elutionspuffer	50 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 8,0; 300 mM NaCl; 50, 100, 150 mM Imidazol
T-Puffer	100 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.8.4.4 Reinigung von DegP_{ΔPDZ1,2}

Das Protein DegP_{ΔPDZ1,2} ließ sich nicht über seinen His-Tag aufreinigen. Zur Reinigung des Proteins wurde ein Liter LB-Medium (200 µg/ml Ampicillin) mit dem Stamm CLC198pIW4 von einer Platte angeimpft. Die Kultur wurde über Tag bei 28 °C inkubiert. Die Induktion erfolgte abends durch eine Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 1 µM. Am Morgen wurden die Zellen geerntet (5', 4 000 x g, RT) und durch einen kalten osmotischen Schock (siehe Kapitel 3.8.4.1) lysiert. Anstelle von 0,5 mM CaCl₂ wurde jedoch 0,5 mM MgCl₂ verwendet. Nach dem Entfernen der Zellen (20', 23 000 x g, 4 °C) wurde das Protein aus dem Überstand mit 95 % Ammoniumsulfat gefällt (Cooper, 1980) und abzentrifugiert (20', 27 000 x g, 4 °C). Das Pellet wurde in 10 ml Puffer A gelöst, mehrmals gegen diesen Puffer dialysiert und auf eine Q-Sepharose Säule (Säulenvolumen: 2 ml) geladen. Das Protein wurde mit einem linearen Gradienten von 100/0 bis 70/30 % Puffer A/Puffer B eluiert. Die Elution von DegP_{ΔPDZ1,2} erfolgte bei 10 % Puffer B. Die Reinheit des eluierten Proteins wurde über ein SDS-Gel mit einer Coomassiefärbung bestimmt und betrug > 80 %.

Zur Lagerung wurde das Protein mit Glycerin zu einer Endkonzentration von 20 % versetzt und bei -70 °C gelagert.

Lösungen:

Puffer A	20 mM Tris/HCl, pH 8,2
Puffer B	20 mM Tris/HCl, pH 8,2; 1 M NaCl

3.8.5 Bestimmung des Oligomerisierungsgrades von DegP und DegP-Derivaten mittels Gelfiltration

Die multimere Organisation von DegP und den DegP-Derivaten wurde durch eine Gelfiltration bestimmt. Hierfür ist eine Superdex200 HR 10/30 Säule (Pharmacia) eingesetzt worden, die mit Laufpuffer äquilibriert war. Die Flußrate betrug 0,5 ml/min und das Auftragsvolumen der Proben 250 µl. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte bei Raumtemperatur. Zur Eichung der Säule dienten die in Tabelle 3-7 angegebenen Proteingemische.

Tab. 3-7. Eichproteine für die Gelfiltration.

Proteingemisch	Protein	Konzentration (in mg/ml)	Molekulargewicht (in Da)
1	Thyroglobulin	2,0	669 000
	Katalase	5,0	232 000
	Albumin	7,0	67 000
	ChymotrypsinogenA	3,0	25 000
2	Ferritin	0,5	444 000
	Aldolase	2,0	158 000
	Ovalbumin	7,0	43 000
	RibonukleaseA	10,0	13 700

Die Eichproteine (Pharmacia) wurden in der in Tabelle 3-7 angegebenen Konzentration im Laufpuffer gelöst. Das Ausschlußvolumen der Säule ist durch Blue Dextran (1 mg/ml in Laufpuffer) bestimmt worden. DegP und seine Derivate wurden in Konzentrationen zwischen 0,8 und 3 mg/ml eingesetzt.

Lösungen:

Laufpuffer 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl

3.8.6 Bestimmung der Konzentration von Proteinlösungen durch UV-Absorption

Die aromatischen Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin sowie Disulfide absorbieren ultraviolettes Licht im Bereich von $\lambda = 230 - 300$ nm. Disulfide zeigen nur eine schwache Absorption bei $\lambda = 280$ nm. Die Extinktionskoeffizienten von Tryptophan und Tyrosin sind um etwa eine Größenordnung höher als der von Phenylalanin. Daraus ergibt sich, daß ein typisches Proteinspektrum vor allem durch den Anteil von Tryptophanen und Tyrosinen bestimmt wird.

Zur Bestimmung des Extinktionskoeffizienten wurde das Verfahren von Gill und von Hippel (Gill und von Hippel, 1989) verwendet. Dabei berechnet man den molaren Extinktionskoeffizienten für das in Guanidiniumhydrochlorid denaturierte Protein mit der Gleichung (9) und die Proteinkonzentration mit der Formel (10).

$$\epsilon_{\text{GdmCl}} = a \times \epsilon_{\text{Trp}} + b \times \epsilon_{\text{Tyr}} + c \times \epsilon_{\text{Cystine}} \quad (9)$$

a: Anzahl der Tryptophane

b: Anzahl der Tyrosine

c: Anzahl der Cystine

$$\text{Proteinkonzentration} = \frac{\text{OD}_{280} \times \text{Mw}}{\epsilon_{\text{GdmCl}}} \left(\frac{\text{mg}}{\text{ml}} \right) \quad (10)$$

OD_{280} : Absorption der Proteinlösung bei $\lambda = 280 \text{ nm}$

Mw: Molekulargewicht des Proteins (in Da)

ϵ_{GdmCl} : molarer Extinktionskoeffizient des Proteins nach Formel (9)

Es wurden die von Gill und von Hippel (Gill und von Hippel, 1989) experimentell bestimmten molaren Extinktionskoeffizienten ϵ verwendet. Sie sind in der Tabelle 3-8 aufgelistet.

Tab. 3-8. Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und von Cystin.

	$\epsilon_{280} (\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1})$
ϵ_{Trp}	5690
ϵ_{Tyr}	1280
ϵ_{Cystin}	120

Der so für denaturierte Proteine errechnete Extinktionskoeffizient ergibt auch eine gute Näherung für das native Protein, da die Unterschiede der Extinktionskoeffizienten in der Regel klein sind (Schmid, 1989). In der Tabelle 3-9 sind die Extinktionskoeffizienten der in dieser Arbeit verwendeten Proteine zusammengefaßt.

Tab. 3-9. Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine.

Protein	Extinktionskoeffizient ($\text{M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)
MalS	174 730
ΔssMalS	175 530
DegP/DegP _{S210A} /DegP _{E196K}	6 400
DegP _{ΔPDZ1} /DegP _{ΔPDZ2}	5 120
PDZ ₁₊₂	2 560
Citrat Synthase	75 530
β -Galaktosidase	261 590

3.8.7 Denaturierung und Rückfaltung der Proteine ΔssMalS , Citrat Synthase und β -Galaktosidase

3.8.7.1 ΔssMalS

Nach seiner Reinigung liegt dieses Protein in 8 M Harnstoff vor. Eine Faltung wurde durch eine 1:25 Verdünnung in T-Puffer herbeigeführt. Um eine Ausbildung von den Disulfidbrücken zu erleichtern, wurde das Oxidationsmittel Glutathion in einer Endkonzentration von

2,5:0,5 mM (Glutathion_{reduziert}/Glutathion_{oxidiert}) zugegeben. Bei der Verwendung der Disulfid-Oxidoreduktase DsbA (Roche Molecular Biochemicals) wurde die oxidierte Form des Faltungskatalysators eingesetzt.

Lösungen:

T-Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 8,7

3.8.7.2 Citrat Synthase

Präparation:

Die Citrat Synthase aus Schweineherz lag mit 10 mg/ml in einer Ammoniumsulfatlösung vor. Diese Lösung wurde über Nacht bei 4 °C gegen TE-Puffer dialysiert. Das Dialysat wurde mittels Centricon-30 Mikrokonzentratoren (Amicon) auf ca. 11 mg/ml aufkonzentriert und abzentrifugiert (30', 27 000 x g, 4 °C), um Präzipitate zu entfernen. Die exakte Konzentrationsbestimmung des Proteins erfolgte photometrisch. Die Proteinlösung wurde aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

Für die Rückfaltungsexperimente wurde ein Aliquot aufgetaut und mit dem TE-Puffer zu einer Konzentration von 0,15 µM Protein verdünnt. Nicht verbrauchtes Material konnte im Kühlschrank für mehrere Tage ohne Aktivitätsverlust gelagert werden.

Denaturierung:

Eine Denaturierung der Citrat Synthase erfolgte chemisch durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid auf 6 M und Dithioerythritol (DTE) auf 20 mM zu 15 µM Citrat Synthase im Renaturierungspuffer. Die Denaturierung erfolgte für zwei Stunden bei Raumtemperatur.

Rückfaltung:

Zur Rückfaltung der chemisch denaturierten Citrat Synthase wurde das Enzym 1:100 in Renaturierungspuffer verdünnt. Die Renaturierung erfolgte bei einer Temperatur von 28 °C unter ständigem Rühren. Zu unterschiedlichen Zeitpunkten ist zur Bestimmung der enzymatischen Aktivität ein Aliquot von 5 µl entnommen worden.

Zur Analyse einer möglichen Funktion der Proteine DegP und DegP_{S210A} als Faltungshelfer, lagen diese Proteine im Renaturierungspuffer in äquimolaren Konzentrationen (bezogen auf ein Dodecamer von DegP bzw. DegP_{S210A}) zum Dimer Citrat Synthase vor. Als Referenzprotein für DegP bzw. DegP_{S210A} wurde Lysozym im gleichen molaren Verhältnis eingesetzt. Da die zugegebenen Proteine ebenfalls im Renaturierungspuffer vorlagen, ist ein Einfluß durch Veränderung der Pufferverhältnisse auszuschließen.

Lösungen:

TE-Puffer 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 2 mM EDTA-Na₂,
Renaturierungspuffer 50 mM Tris/HCl, pH 8,0

3.8.7.3 β -Galaktosidase

Präparation:

Das Enzym β -Galaktosidase (1 mg Lyophilisat) wurde mit 1 ml bidestilliertem Wasser rekonstituiert und gegen einen Liter Z-Puffer (siehe Kapitel 3.8.3.2) bei 4 °C dialysiert. Das Dialysat wurde zur Abtrennung von Präzipitaten zentrifugiert (30', 27 000 x g, 4 °C). Die Proteinkonzentration des Überstands wurde photometrisch überprüft und betrug 1 mg/ml (8,6 μ M bezogen auf das Monomer).

Denaturierung:

Die Denaturierung der β -Galaktosidase erfolgte durch Guanidiniumhydrochlorid. Hierzu wurden der β -Galaktosidase Lösung Guanidiniumhydrochlorid und Dithiothreitol zu einer Endkonzentration von 6 M bzw. 20 mM zugegeben und zwei Stunden bei Raumtemperatur denaturiert. Daran schloß sich direkt das Renaturierungsexperiment an.

Rückfaltung:

Die Rückfaltung der so denaturierten β -Galaktosidase wurde ermöglicht durch eine 1:100 Verdünnung in R-Puffer, der auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt war.

Das Protein DegP_{S210A} wurde in äquimolaren Konzentrationen (bezogen auf ein Dodecamer von DegP_{S210A}), zum Monomer β -Galaktosidase eingesetzt. Das Referenzprotein Lysozym wurde in einem zweifachen molaren Überschuß (bezogen auf die jeweiligen Monomere) eingesetzt. Da die Proteine DegP_{S210A} und Lysozym (beide in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5) in einem Volumen zugegeben wurden, das weniger als drei Prozent des Endvolumens betrug, ist ein Einfluß durch eine Pufferveränderung auszuschließen.

R-Puffer:

Na ₂ HPO ₄	60 mM
NaH ₂ PO ₄	40 mM
KCl	10 mM
MgSO ₄	1 mM
DTT	10 mM

3.8.8 Pulse-Chase-Experimente zur radioaktiven Markierung von zellulären Proteinen und Immunpräzipitation

Die Zellen wurden 1:100 aus einer LB-Vorkultur angeimpft und über Nacht in M9-Medium (supplementiert mit 0,2 % Glycerin, 18 Aminosäuren (ohne Methionin und Cystein), 0,01 % Thiamin) bei 28 °C bzw. 37 °C angezogen. Die ausgewachsene Kultur wurde 1:20 in frisches Medium überimpft und bis zu einer OD₅₇₈ von 0,3 - 0,4 kultiviert. In ein vorgewärmtes Kulturröhrchen wurden 3 ml der Kultur pipettiert. Der Rest der Kultur verblieb zur späteren Bestimmung der OD₅₇₈ auf Eis. Vor der Zugabe von ³⁵S-Methionin (Pulse) wurde die Kultur für fünf Minuten intensiv geschüttelt. Nach der Zugabe von 20 μ Ci ³⁵S-Methionin (Amersham, Braunschweig) pro ml Zellen (30 μ l einer 2 μ Ci/ μ l Stamm-

lösung) wurde die Kultur 45 Sekunden stark geschüttelt. Ein Aliquot von 0,8 ml wurde entnommen (0-Minuten-Probe) und in ein auf Eis vorgekühltes Eppendorfgefäß mit einer Vorlage von 100 µl 1 M Iodacetamid pipettiert. Das Iodacetamid verhindert eine Ausbildung von Disulfidbrücken durch eine Oxidation an der Luft. Die Proben wurden auf Eis belassen, bis alle weiteren abgenommen waren. Zu den verbleibenden 2,2 ml der Kultur wurden 200 µl 0,4 M unmarkiertes Methionin zugemischt (Chase). Nach 5 und 15 Minuten wurde je 1 ml entnommen und wie die 0-Minuten-Probe behandelt.

Die Zellen wurden abzentrifugiert (1', 17 000 x g, RT) und in 30 µl SDS-Puffer resuspendiert. Die Ansätze wurden für drei Minuten bei 95 °C erhitzt; anschließend mit 970 µl HS-Puffer versetzt. Durch die Zugabe von HS-Puffer wird die SDS-Konzentration in der Probe soweit verdünnt, daß die Antikörper der nachfolgenden Immunpräzipitation binden können.

Um eine unspezifische Bindung von Proteinen an die Protein A-Sepharose (Pharmacia) bei der Immunpräzipitation auszuschließen, wurde eine Prä-Adsorption durchgeführt. Hierfür wurden 20 µl gequollene Protein A-Sepharose zu den Proben pipettiert und für 30 Minuten auf Eis inkubiert, wobei mehrmals gemischt wurde. Durch eine Zentrifugation (1', 1 500 x g, RT) wurde die Sepharose pelletiert und 970 µl Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach der Zugabe von 2 µl α-MalS-Antiserum ist über Nacht auf Eis inkubiert worden.

Die Immunpräzipitation erfolgte mit 20 µl gequollenen Protein A-Sepharose-Perlen für 30 Minuten auf Eis, wobei mehrmals gemischt wurde. Die Protein A-Sepharose-Perlen sind abzentrifugiert (1', 1 500 x g, RT) und der Überstand vorsichtig abgesaugt worden. Hierbei läßt man immer eine kleine Menge des Überstands zurück, da das Pellet sehr instabil ist. Das Pellet wurde mit jeweils 750 µl HS-Puffer, Li-Puffer und T-Puffer gewaschen und schließlich für die Gelelektrophorese in 50 µl SDS-Probenpuffer mit 20 mM Iodacetamid aufgenommen. Vor der Elektrophorese sind die Proben für fünf Minuten auf 95 °C erhitzt und abzentrifugiert (5', > 10 000 x g, RT) worden, um die Antigen-Antikörper-Komplexe von den Gelperlen abzulösen. Der Überstand wurde abgenommen, und je nach der optischer Dichte der eingesetzten Zellsuspension sind 10 - 20 µl auf ein 10 %-iges SDS-Gel aufgetragen worden. Nach der Auftrennung der Proteine wurde das Gel auf ein Filterpapier (Zuschnitte #2208; Schleicher & Schüll) gelegt und im Vakuumheißtrockner bei 75 °C für eine Stunde getrocknet. Das getrocknete Gel wurde in eine Autoradiographiekassette eingelegt und mit Medical X-Ray Filmen (Fuji, Tokio, Japan) exponiert.

Quellen der Protein A-Sepharose:

Eine Spatelspitze (ein Gelvolumen von ca. 100 µl ist ausreichend für 10 Proben) wurde mit 1 ml HS-Puffer auf Eis für 10 Minuten gequollen, dann dreimal mit 1 ml HS-Puffer bei Raumtemperatur gewaschen (max. 1 500 x g) und schließlich im gleichen Volumen HS-Puffer resuspendiert.

Lösungen:

SDS-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 mM EDTA-Na ₂ ; 1 % SDS
HS-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 1 M NaCl; 1 mM EDTA-Na ₂ ; 1 % Triton X-100
Li-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 0,5 M LiCl; 0,1 % SDS
T-Puffer	50 mM Tris/HCl, pH 7,5

3.9. Elektronenmikroskopie von gereinigten Proteinen

Für elektronenmikroskopische Strukturuntersuchungen wurden frisch gereinigte und nicht eingefrorene Proteinlösungen verwendet, um eine optimale Strukturinformation zu erhalten.

3.9.1 MaLS

Nach der Reinigung wurde das Protein gegen 20 mM Triethanolamin, pH 7,5 dialysiert und im selben Puffer auf Konzentrationen zwischen 12,5 und 50 µg/ml verdünnt. Zur Entfernung möglicher Aggregate wurde die Proteinlösungen kurz vor dem Gebrauch abzentrifugiert (10', 17 000 x g, RT). Die Objekte wurden direkt nach ihrer Herstellung mit einem EM10 C2 (Zeiss, Oberkochen) bei 80 kV und einer standardisierten Primärvergrößerung von 36 000 x untersucht.

1. Negativkontrastierung

Zur Negativkontrastierung wurde MaLS aus 30 µl Proteinlösung an hydrophilisierte Kohlefilme auf 300 mesh Kupfernetzchen adsorbiert (60''), mit 30 µl Glutaraldehyd fixiert (30'') und kurz mit bidestilliertem Wasser gespült (10''). Abschließend wurde das Präparat mit Uranylacetat oder Phosphorwolframsäure kontrastiert: 30 µl Färbelösung wurden auf das Präparat gegeben und dann langsam mit Filterpapier bis auf einen dünnen Flüssigkeitsfilm abgesaugt. Direkt nach dem Eintrocknen dieses Filmes wurden die Präparate mikroskopiert. Reduziertes MaLS wurde durch eine fünfminütige Präinkubation mit 30 µM DTT vor der Adsorption an den Kohlefilm hergestellt.

2. Pt/C-Schrägbedampfung von MaLS

Für die Rotationsbedampfung von MaLS wurden 18 µl MaLS mit 12 µl Glycerin (ultra pure, BRL, Gaithersburg, MD, USA) gemischt. Das gesamte Probenvolumen wurde aus einer 200 µl Pipettenspitze in einem Stickstoffstrom, der mit 2,5 bar Vordruck durch eine 0,8 mm Kanüle erzeugt wurde, auf ein in einer Entfernung von 35 cm positioniertes, frisch gespaltenes Glimmerplättchen versprüht (Tyler und Brandon, 1980). Dieses Präparat wurde in einem Rotationsbedampfer (Balzers S.p.A; Milano, Italien) bei einem Vakuum von 10⁻⁵ mbar unter einem Winkel von 5° mit Platin/Kohle (95/5) bedampft. Die Dicke der Metallschicht wurde durch einen Quarzkristall-Monitor kontrolliert. Der Metallfilm wurde durch eine Kegelbedampfung mit einer zusätzlichen Kohleschicht verstärkt. Die Filme sind auf bidestilliertes Wasser abgeschwemmt und auf 300 mesh Kupfernetzchen montiert worden.

3.9.2 Negativkontrastierung von DegP_{S210A}

Von DegP_{S210A} wurden nur negativkontrastierte Präparate hergestellt. Das nach den Angaben in Kapitel 3.8.4.3 gereinigte Protein wurde über eine Gelfiltration (Kapitel 3.8.5) zusätzlich gereinigt. Aus 30 µl Proteinlösung (30 - 100 µg/ml) wurde DegP_{S210A} an die hydrophilisierten Kohlefilme adsorbiert (60'). Überschüssiges Protein ist mit bidestilliertem Wasser abgewaschen und anschließend mit Uranylacetat (Kapitel 3.9.1) kontrastiert worden. Die Präparate wurden mit einem Philips EM 420 bei 60 kV und einer standardisierten Primärvergrößerung von 48 000 x untersucht.

Lösungen:

PBS	8 mM Na ₂ HPO ₄ ; 1,47 mM KH ₂ PO ₄ , pH 7,2; 137 mM NaCl; 5,4 mM KCl
Glutaraldehyd	0,1 % (v/v) Glutaraldehyd in PBS
Uranylacetat	2 % (w/v) Uranylacetat, pH 4,5 in H ₂ O _{bidest.}
Phosphorwolframsäure	1 % (w/v) Phosphorwolframsäure, pH 7,2 in H ₂ O _{bidest.}

3.10 Computeranalysen und Homologieuntersuchungen von DNA- und Aminosäuresequenzen und Bildverarbeitung mit Hilfe von Computerprogrammen

Die DNA-Sequenzen wurden mit Hilfe des Computerprogrammes 'DNA-Strider v1.2' verwaltet.

Die Aminosäure-Sequenzhomologie von MalS und der apikalen Domäne von GroEL wurde mit dem Programm 'CLUSTAL W v6.1' erstellt. Für die Aminosäure-Sequenzvergleiche ist das Programm 'BLASTP v2.0.4' verwendet worden. Die Sekundärstrukturvorhersagen der Proteine erfolgte mit Hilfe des Programms 'PHD' (Rost und Sander, 1994) (Rost et al., 1994).

Die Bearbeitung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen von MalS erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm 'Adobe Photoshop v4.0'.

Zur Quantifizierung von Proteinbanden auf den Coomassie gefärbten SDS-Gelen, auf den Western-Transfers und bei den Autoradiographien diente das Programm 'NIH Image v1.59b9'. Diese Methode ist mit Fehlern behaftet, da eine strenge Kontrolle der linearen Intensitätsbeziehungen nicht aufgestellt werden konnte.

4. ERGEBNISSE

4.1 Reinigung und biochemische Charakterisierung von MaIS

4.1.1 Reinigung von MaIS

Für die Reinigung der periplasmatischen Amylase MaIS wurde zunächst der Stamm CS66 konstruiert. In diesem Stamm ist das chromosomale Gen für das Maltosebindeprotein (MBP) deletiert. Dadurch wird eine Koreinigung des MBP mit MaIS unterbunden. Das MBP besitzt einen identischen isoelektrischen Punkt wie MaIS und weist dadurch das gleiche Elutionsverhalten auf einem Ionenaustauscher auf.

Die Überexpression von *maIS* erfolgte von dem Plasmid pUMa103 (Abbildung 4-1). *maIS* ist auf diesem Plasmid unter Kontrolle seines eigenen Promotors. Eine Induktion des Promotors war nicht notwendig, da der Stamm CS66 den Aktivator des Maltoseoperons MaIT konstitutiv exprimiert. Um Bedingungen für eine optimale Überexpression zu finden, wurden drei verschiedene Anzuchtmedien getestet. Bei einem Wachstum in dem Minimalmedium 9, das mit Casaminsäuren supplementiert war, konnte eine über dreifach höhere Expression als in LB- oder SOP-Medium festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). Deshalb wurde für die Reinigungsexperimente dieses Medium verwendet.

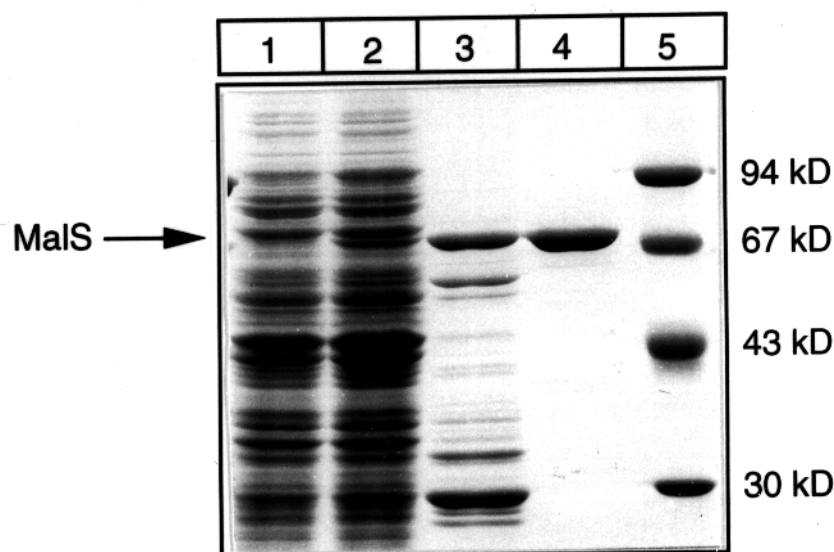


Abb. 4-1. Reinigung von MaIS.

Für die Abbildung 4-1 wurden je 10 µg Protein aus den einzelnen Reinigungsschritten mittels einer reduzierenden 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie Blau angefärbt. Die Position von MaIS ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

1. Ganzellextrakt von CS66; 2. Ganzellextrakt von CS66pUMa103; 3. Fraktion des kalten osmotischen Schocks; 4. zusammengefaßte MaIS-Fraktionen nach der Anionenaustauscher-Chromatographie (MonoQ); 5. Molekulargewichtsstandard.

Die für die Reinigung angezogenen Zellen wurden zunächst einem kalten osmotischen Schock unterzogen. Hierdurch erhält man eine Fraktion, die nur aus den löslichen periplas-

matischen Proteinen besteht. Aus dieser Lösung wurde MalS durch ein Lyophilisieren und eine anschließende Anionenaustauscher-Chromatographie (MonoQ) gereinigt (Kapitel 3.8.4.1). Von den einzelnen Reinigungsschritten wurden Proben entnommen und auf einem Polyacrylamid-Gel analysiert. Die einzelnen Schritte und der Erfolg der Reinigung gehen aus der Abbildung 4-1 hervor. Nach der MonoQ-Säule lag MalS zu > 95 % rein vor, da keine weiteren Proteinbanden auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel nachgewiesen werden konnten. Die Reinigung wurde durch einen Western-Transfer mit α -MalS-Antiserum verifiziert (Daten nicht gezeigt).

4.1.2 Biochemische Charakterisierung von MalS

Die Substratspezifität der enzymatischen Aktivität von MalS ist bereits charakterisiert (Freundlieb und Boos, 1986). Der Einfluß von biochemischen Faktoren auf die enzymatische Aktivität und Proteinstabilität von gereinigtem MalS wurde untersucht. Die genaue Kenntnis war wichtig für die nachfolgenden Untersuchungen der Faltung von MalS *in vivo* und *in vitro*.

4.1.2.1 Die enzymatische Aktivität von MalS ist abhängig von bivalenten Kationen

Die Abhängigkeit anderer Amylasen von Ca^{2+} ist bekannt (Boel et al., 1990; Buisson et al., 1987; MacGregor und Svensson, 1989). Um eine Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von MalS von bivalenten Kationen zu untersuchen, wurden durch die Zugabe des Chelators EDTA in unterschiedlichen Konzentrationen schrittweise zweiwertige Kationen entfernt. Anschließend war die MalS-Aktivität bestimmt worden. Es ergab sich, daß die MalS-Aktivität durch den Entzug von zweiwertigen Kationen nahezu vollständig gehemmt werden kann (Tabelle 4-1).

Tab. 4-1. Abhängigkeit der MalS-Aktivität von bivalenten Kationen.

Durch die Zugabe von EDTA in unterschiedlichen Konzentrationen wurden gebundene zweiwertige Kationen entfernt. Die MalS-Konzentration betrug 39 nM. Die Inkubation mit EDTA erfolgte fünf Minuten vor der Bestimmung der enzymatischen Aktivität durch die Zugabe des Substrats PG-6. Eine Aktivität von 100 % entspricht einem Substratumsatz von 403 nmol hydrolysiertem PG-6 pro min und mg Protein. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte als Doppelbestimmung in 50 mM Tris/HCl pH 7,5. Die Abweichung der Meßwerte lag unter 2 %.

EDTA-Konzentration (in mM)	% der maximalen Aktivität
0	100
10^{-3}	97
10^{-2}	89
10^{-1}	8
1	4
10	2

4.1.2.2 MalS hat das Kation Ca^{2+} gebunden

Um das für die Stabilität und die Aktivität notwendige Kation zu identifizieren, wurde mit EDTA behandeltes MalS mit verschiedenen zweiwertigen Kationen rücktitriert. Mit steigender Kationenkonzentration nahm die Aktivität zu und erreichte ein Maximum. Die Aktivitätswerte für dieses Maximum sind in der Tabelle 4-2 aufgeführt. Nur durch Ca^{2+} konnte die

ursprüngliche Aktivität zu 100 % zurückgewonnen werden. Zn^{2+} war ohne Einfluß auf die Reaktivierung. Mit Mg^{2+} bzw. Mn^{2+} konnte nur eine unvollständige Reaktivierung (77 bzw. 74 %) festgestellt werden. Eine Steigerung der ursprünglichen Aktivität (130 %) trat mit Ba^{2+} auf. Die Ergebnisse der Rücktitrationen sind in der Tabelle 4-2 dargestellt.

Tab. 4-2. Rücktitration von EDTA-behandeltem MalS mit verschiedenen zweiwertigen Kationen.

MalS (15 nM) wurde durch fünfminütige Inkubation mit 1 mM EDTA das gebundene zweiwertige Kation entzogen. Die Reaktivierung von MalS wurde durch die Zugabe von Chloridlösungen der entsprechenden Salze zu einer Konzentration von 10 mM durchgeführt. Nach einer Inkubation für fünf Minuten wurde die Bestimmung der MalS-Aktivität in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei Raumtemperatur als Doppelbestimmung durchgeführt. Die MalS-Aktivität vor der EDTA-Inkubation betrug 403 nmol hydrolysiertem PG-6 pro min und mg Protein.

Kation	MalS-Aktivität (in nmol/(min mg))
-	14
Ca^{2+}	400
Ba^{2+}	520
Mg^{2+}	309
Mn^{2+}	296
Zn^{2+}	5

4.1.2.3 MalS hat ein pH-Optimum im alkalischen Bereich

Der Einfluß des pH-Wertes auf die enzymatische Aktivität von MalS wurde zwischen pH 5,0 und pH 9,5 untersucht (Abbildung 4-2).

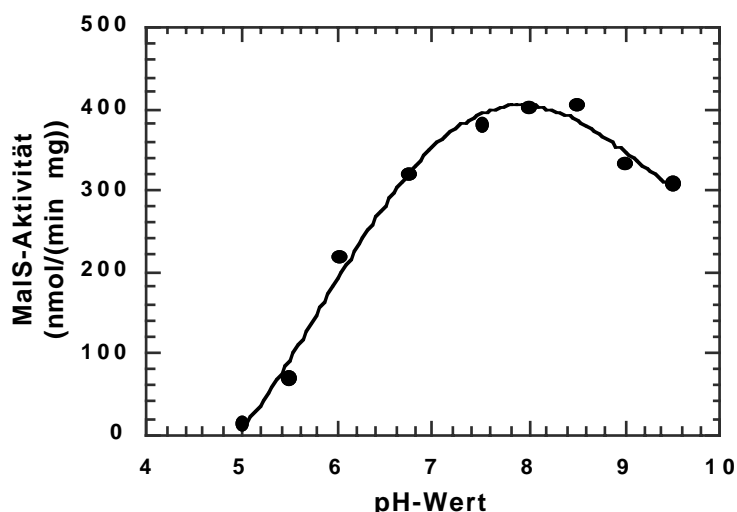


Abb. 4-2. Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität von MalS.

Die Aktivität von MalS (1,16 µg/ml) wurde von pH 6,0 bis pH 9,5 in 50 mM Tris/HCl und von pH 5,0 bis pH 8,0 in 50 mM BisTris/HCl bestimmt. Vor der Bestimmung der Absorption bei $\lambda = 405$ nm wurde der pH-Wert durch eine Zugabe von Na_2CO_3 zu einer Endkonzentration von 750 mM ins Alkalische überführt. Als Substrat für die enzymatische Reaktion bei Raumtemperatur wurde PG-6 verwendet. Die Meßpunkte resultieren aus dem Mittel zweier unabhängiger Bestimmungen, deren Abweichung weniger als 5 % betrug.

Die Färbung, die durch die Abspaltung der Nitrophenyl-Gruppe von dem Substrat PG-6 auftritt, ist unterhalb von pH 8,0 von der Konzentration der Hydrogenionen abhängig (Lorentz, 1983). Deshalb wurde zur Messung der Absorption der pH-Wert durch Zugabe von Na_2CO_3 ins Alkalische überführt. MalS zeigt nur eine geringe enzymatische Aktivität im sauren pH-Bereich, jedoch ein breites Aktivitätsoptimum bei alkalischen pH-Werten.

4.1.2.4 Mit steigender Osmolarität nimmt die Aktivität von MalS ab

Das Periplasma steht in einem ständigem Austausch mit dem umgebenden Medium. Insbesondere Salze können die Aktivität und Stabilität von periplasmatischen Proteinen beeinflussen. Ist die MalS-Aktivität abhängig von der Osmolarität des umgebenden Mediums? Dazu wurde die MalS-Aktivität unter Zugabe von verschiedenen Konzentrationen von NaCl zum Reaktionspuffer bestimmt. Die Aktivitäten sind in Abbildung 4-3 gezeigt. Mit zunehmender Osmolarität nahm die Amylaseaktivität ab. Unter den hochosmolaren Bedingungen (1 M NaCl) war die enzymatische Aktivität auf unter die Hälfte des Wertes der niederosmolaren Bedingung gefallen.

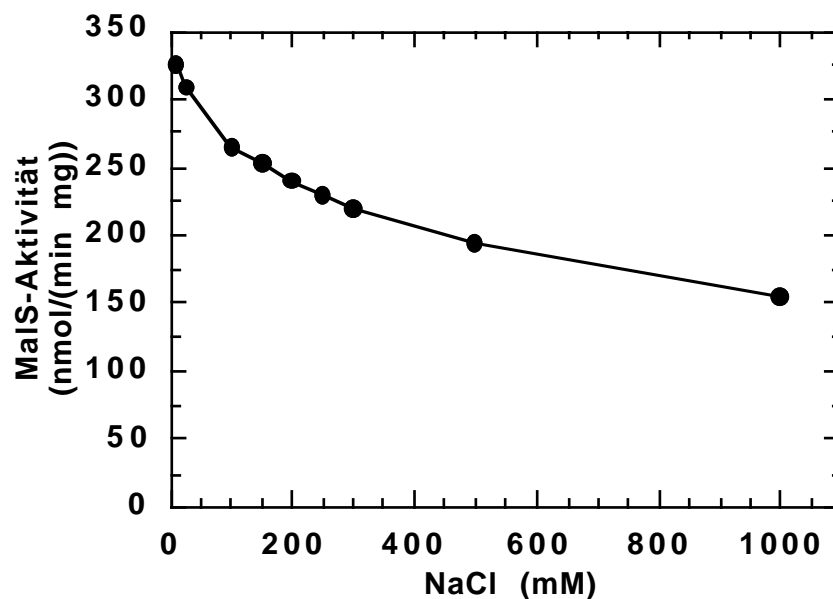


Abb. 4-3. Einfluß der Osmolarität auf die MalS-Aktivität.

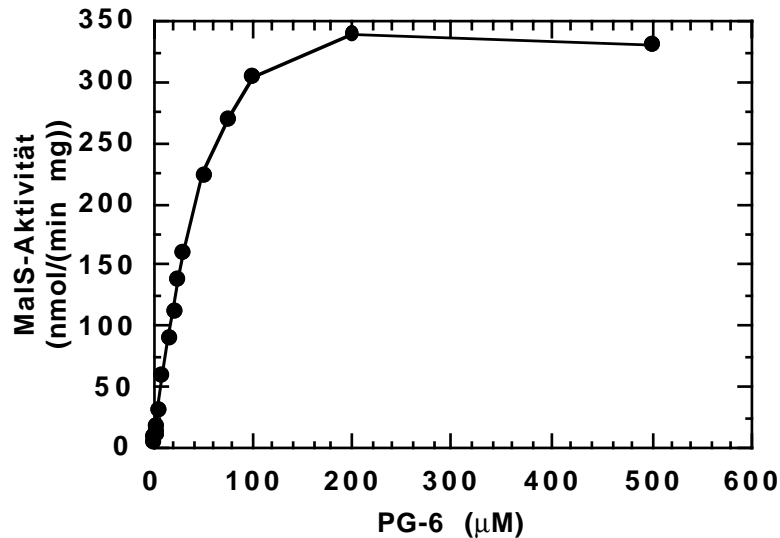
Die Aktivität von MalS (1,16 $\mu\text{g}/\text{ml}$) wurde in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM CaCl_2 in Gegenwart unterschiedlicher NaCl-Konzentrationen bestimmt. Vor dem Start der enzymatischen Reaktion fand eine Inkubation des Enzyms unter der entsprechenden Osmolarität für fünf Minuten statt. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur.

4.1.2.5 Die K_M von MalS beträgt 49 μM und die v_{max} 0,36 $\mu\text{mol}/\text{min}$

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter von MalS wurde die Amylaseaktivität bei unterschiedlichen Konzentrationen des Substrats PG-6 untersucht. Es wurden Substratkonzentrationen von 0,5 bis 500 μM eingesetzt (Abbildung 4-4 (A)). Die Substrataffinität (K_M) und

die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) wurden aus der reziproken Auftragung nach Lineweaver und Burk ermittelt (Abbildung 4-4 (B)). Die K_M für MaIS betrug $49 \mu\text{M}$ und die v_{\max} $0,36 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein.

A.



B.

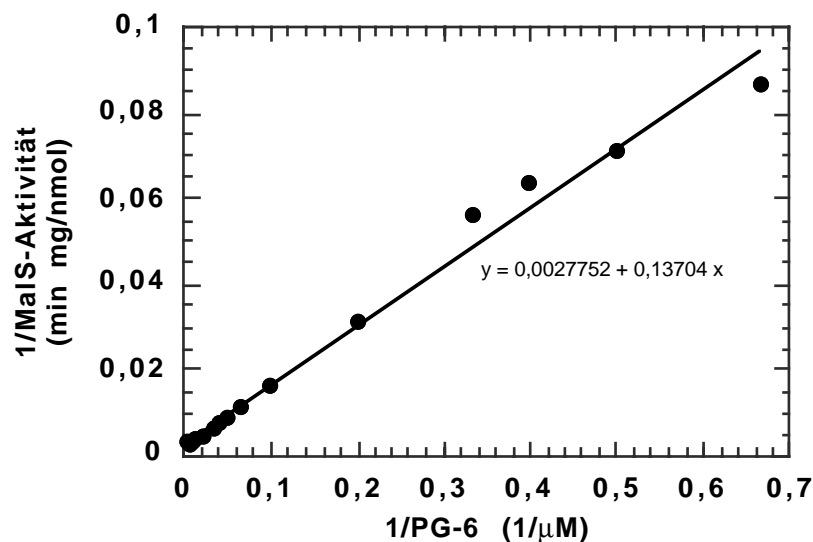


Abb. 4-4. Bestimmung der kinetischen Parameter von MaIS.

Die Messungen wurden in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM CaCl_2 bei Raumtemperatur durchgeführt. Als Substrat wurde das PG-6 in Konzentrationen zwischen 0,5 und 500 μM eingesetzt. Die MaIS-Konzentration betrug 1,45 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Die Werte aus vier voneinander unabhängigen Messungen sind gemittelt worden. Die Abweichung lag unter 5 %.

A) Die MaIS-Aktivität in Abhängigkeit von der Substratkonzentration.

B) Lineweaver-Burk-Plot: Zur Ermittlung der kinetischen Parameter wurde die enzymatische Aktivität gegen die Substratkonzentration reziprok aufgetragen. Aus der Gleichung der Ausgleichsgeraden konnte nach Lineweaver-Burk die Substrataffinität (K_M) und die maximale Reaktionsgeschwindigkeit (v_{\max}) berechnet werden.

4.1.2.6 Die Reduktion der Disulfidbrücken im nativen Protein hat keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von MalS

Um eine mögliche Aufgabe der Disulfidbrücken in MalS für das native Protein zu bestimmen, wurde der Einfluß des Reduktans DTT auf die Aktivität von MalS untersucht. Die Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT zeigte keinen negativen Effekt auf die enzymatische Aktivität (Tabelle 4-3). Mit steigender DTT-Konzentration war hingegen ein leichter Anstieg um maximal 25 % meßbar. Dies könnte durch eine verbesserte Zugänglichkeit des Substrats nach der Reduktion der Disulfidbrücken zu erklären sein.

Tab. 4-3. MalS-Aktivität nach Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT.

1,16 µg/ml MalS in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM CaCl₂ wurde mit unterschiedlichen DTT-Konzentrationen für fünf Minuten inkubiert, bevor die Bestimmung der enzymatischen Aktivität bei Raumtemperatur mit PG-6 stattfand.

DTT (in mM)	MalS-Aktivität (in nmol/(min mg))
0	292
10 ⁻²	299
10 ⁻¹	315
1	315
10	368
30	349

4.1.2.7 Die Reduktion der Disulfidbrücken führt zur Aggregation von MalS

Eine mögliche Aggregation von MalS nach der Reduktion ist durch ein Abzentrifugieren nach dem Öffnen der Disulfidbrücken durch DTT überprüft worden. Die im Überstand vorhandene MalS-Menge wurde durch die verbliebene enzymatische Aktivität bestimmt und mit einem Ansatz, der nicht abzentrifugiert wurde, verglichen (Tabelle 4-4).

Tab. 4-4. Nachweis der Aggregation von reduziertem MalS durch Zentrifugation.

MalS (16 nM) in 50 mM Tris/HCl pH 8,0; 5 mM CaCl₂ wurde durch eine Inkubation mit DTT (30 mM Endkonzentration) reduziert. Nach fünf Minuten wurde ein Aliquot entnommen und abzentrifugiert (20' ; 17 300 x g; RT). Der Überstand wurde abgenommen, die enzymatische Aktivität von MalS bestimmt und mit der Aktivität eines nicht abzentrifugierten Ansatzes verglichen. Eine Aktivität von 100 % entspricht 350 nmol hydrolysiertem PG-6 pro min und mg Protein. Der Versuch wurde als Doppelbestimmung durchgeführt, die Abweichung betrug 1 %.

	MalS-Aktivität (in %)
nicht abzentrifugiert	100
abzentrifugiert	16

Nach der Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT war MalS unlöslich. Unlösliches MalS konnte durch eine Zentrifugation abgetrennt werden. Nur ein geringer Anteil blieb in löslicher Form (16 %). Durch die Reduktion der Disulfidbrücken scheint die Struktur von MalS erheblich verändert zu sein, was zu einer Aggregation führt. Trotz dieser Strukturverän-

derung und der damit verbundenen Aggregation ist MaIS noch vollständig enzymatisch aktiv. Die Strukturveränderung in MaIS scheint keinen negativen Einfluß auf das aktive Zentrum zu haben.

4.1.2.8 MaIS kann durch das Detergens SDS denaturiert werden

Eine Resistenz gegenüber dem Detergens SDS wurde für eine α -Amylase aus einem Pilz beschrieben (Arakawa et al., 1992). Deshalb ist geprüft worden, ob MaIS ebenfalls diese Stabilität aufweist. Nach der Inkubation mit verschiedenen SDS-Konzentrationen wurde die enzymatische Aktivität von MaIS bestimmt. Hierfür ist oxidiertes und reduziertes MaIS eingesetzt worden, um zusätzlich einen möglichen Einfluß der Disulfidbrücken auf die Stabilität zu untersuchen. Das Ergebnis zeigt die Abbildung 4-5.

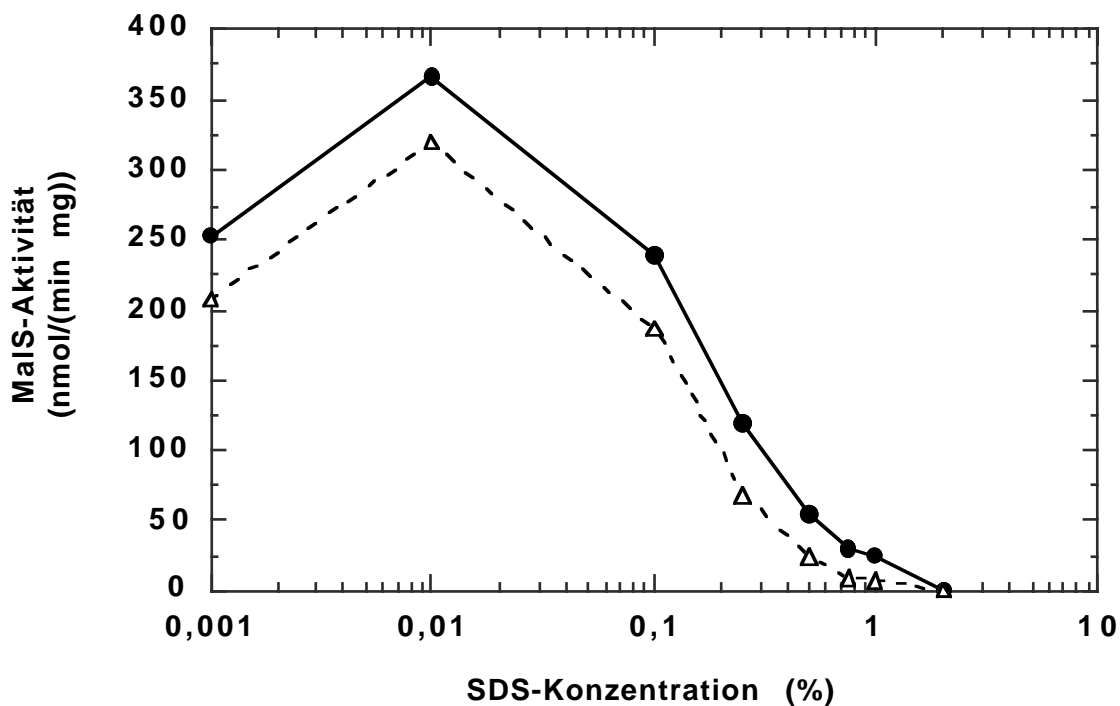


Abb. 4-5. Denaturierung von reduziertem und oxidiertem MaIS durch SDS.

Oxidiertes (---Δ---) und reduziertes (—●—) MaIS (1,16 μ g/ml) wurden mit unterschiedlichen SDS-Konzentrationen versetzt. Reduziertes MaIS wurde durch fünfminütige Inkubation mit 10 mM DTT vor Zugabe des SDS erhalten. Die enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von PG-6 gestartet und in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 durchgeführt. Die MaIS-Aktivität in Abwesenheit von SDS betrug 235 nmol/(min mg) und nach Reduktion der Disulfidbrücken 270 nmol/(min mg).

MaIS ist sensitiv gegenüber SDS. Schon geringe SDS-Konzentrationen (0,25 %) reduzierten die MaIS-Aktivität und oberhalb 0,7 % war MaIS inaktiv. Es konnte kein Unterschied zwischen oxidiertem und reduziertem MaIS festgestellt werden.

4.1.2.9 Die Disulfidbrücken von MaIS haben keinen Einfluß auf die thermische Stabilität des Proteins

Die thermische Stabilität vieler Proteine wird durch ihre Disulfidbrücken unterstützt (Luckey et al., 1991; Matsumura et al., 1991; Schultz et al., 1987; Vogl et al., 1995). Nachdem die Disulfidbrücken in MaIS offensichtlich nicht für die enzymatische Aktivität notwendig sind (Kapitel 4.1.2.6), wurde untersucht, ob die Disulfidbrücken dem nativen Protein eine erhöhte thermische Stabilität verleihen. Die thermische Stabilität ist deshalb unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen untersucht worden. MaIS wurde hierzu für fünf Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Nach dem Abkühlen des Ansatzes auf Raumtemperatur ist die enzymatische Aktivität bestimmt worden (Abbildung 4-6).

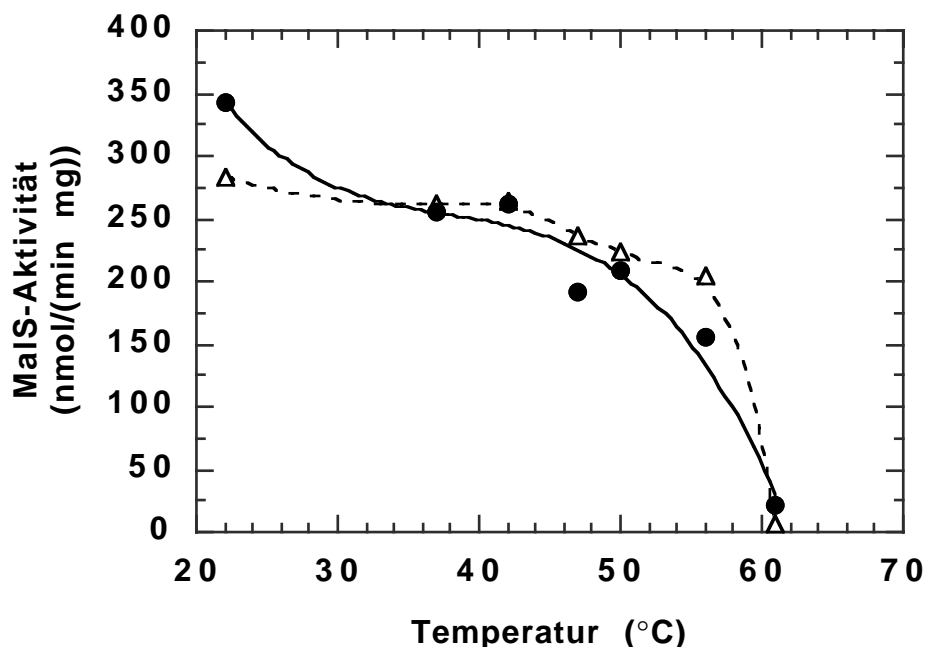


Abb. 4-6. Thermische Stabilität von MaIS unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen.

Zur Bestimmung der thermischen Stabilität wurde reduziertes (—●—) und oxidiertes (--Δ--) MaIS (1,16 µg/ml) in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0; 5 mM CaCl₂ für fünf Minuten bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Disulfidbrücken in MaIS wurden durch eine Zugabe von DTT zu 10 mM fünf Minuten vor der Temperaturerhöhung reduziert. Nach fünfminütigem Abkühlen auf Raumtemperatur wurde die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von PG-6 gestartet.

Durch die MaIS-Aktivitätstests konnte nur ein geringer Einfluß der Disulfidbrücken auf die thermische Stabilität von MaIS festgestellt werden. Eine Reduktion der enzymatischen Aktivität trat ab einer Temperatur von 55 °C ein. Der vollständige Verlust der enzymatischen Aktivität konnte sowohl unter reduzierenden als auch unter nicht-reduzierenden Bedingungen ab 61 °C festgestellt werden. Die MaIS-Aktivitätstests zeigten, daß der Beitrag der Disulfidbrücken zur thermischen Stabilität des Proteins gering ist.

4.1.2.10 Reduziertes MaIS kann reoxidiert werden

Unter reduzierenden Bedingungen wandert MaIS auf einem SDS-Polyacrylamidgel bei seinem theoretischen Molekulargewicht von 74 kDa. Unter nicht reduzierenden Bedingungen ist das Laufverhalten verändert, und das Protein hat eine apparente molekulare Masse von 90 kDa. Die gleiche Änderung wurde nach einer Reoxidation von reduziertem MaIS beobachtet. Die Reoxidation ist durch die Zugabe von oxidiertem Glutathion zu davor reduziertem MaIS erzielt worden. Der Status der Disulfidbrücken in MaIS kann deshalb durch das Laufverhalten auf SDS-Gelen bestimmt werden (Abbildung 4-7).

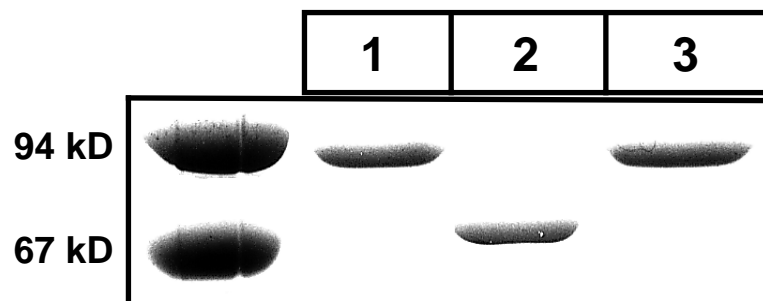


Abb. 4-7. Reduktion und Reoxidation von MaIS.

MaIS (1,7 μ M) wurde durch eine Inkubation für 15 Minuten mit DTT (30 mM Endkonzentration) bei Raumtemperatur reduziert. Die Reoxidation von reduziertem MaIS wurde durch eine Zugabe von oxidiertem Glutathion zu einer Endkonzentration von 130 mM durchgeführt. Nach einer Inkubation für 40 Minuten bei Raumtemperatur ist Iodacetamid zu einer finalen Konzentration von 150 mM zugefügt und der Ansatz für weitere fünf Minuten bei Raumtemperatur inkubiert worden. Die Proben sind mit Methanol/ CHCl_3 gefällt, das Pellet in nicht-reduzierendem SDS-Probenpuffer gelöst und gelelektrophoretisch aufgetrennt worden.

1. oxidiertes MaIS; 2. reduziertem MaIS; 3. reoxidiertes MaIS.

4.1.2.11 Acarbose ist ein schwacher Inhibitor für MaIS

Das Pseudooligosaccharid Acarbose ist ein Inhibitor für viele Amylasen, Glucosidasen und Cyclodextrin Glycosyltransferasen. Der Inhibitor hat klinische Bedeutung und wird für die Therapie von TypIII Diabetes eingesetzt. Die Substanz besteht aus einem ungesättigten Aminocyclitol-, einem Deoxyhexaose- und einem Maltoseanteil. Die Kenntnis eines Inhibitors für MaIS könnte das Kristallisieren des Proteins für eine Röntgenstrukturanalyse erleichtern. In der Tabelle 4-5 ist die MaIS-Aktivität bei unterschiedlichen Acarbosekonzentrationen aufgelistet.

Tab. 4-5. Inhibition der MalS-Aktivität durch Acarbose.

MalS (15 nM) in 100 mM Tris/HCl, pH 8,0 wurde mit der entsprechenden Acarbosekonzentration für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte durch die Zugabe von PG-6 (2 mM Endkonzentration). Eine MalS-Aktivität von 100 % entspricht 390 nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg MalS.

Acarbosekonzentration (in mM)	MalS-Aktivität (in %)
0	100
1×10^{-3}	105
1×10^{-2}	108
5×10^{-2}	92
1×10^{-1}	96
5×10^{-1}	67
1	52
10	10

Für MalS war nur ein schwacher inhibitorischer Effekt nachweisbar. Erst bei Acarbosekonzentrationen, die zehnmal geringer waren als die Substratkonzentration PG-6 (2 mM), trat eine beginnende Hemmung der Aktivität auf (67 %). Eine Hemmung auf 10 % der Ausgangsaktivität konnte erst bei Acarbosekonzentrationen, die höher waren als die Substratkonzentration PG-6, erreicht werden. Die Affinität der Acarbose zu MalS ist somit nicht ausreichend für eine effektive Inhibition.

4.2 Elektronenmikroskopie von MalS¹

Um eine Idee von der Struktur von MalS zu erhalten, wurden Präparate des gereinigten Enzyms für die Transmissions-Elektronenmikroskopie hergestellt. Zwei unterschiedliche Techniken kamen hierbei zur Anwendung: i) Negativkontrastierung und ii) Glycerin-Sprüh-Präparation mit Pt/C-Rotationsbedampfung. Die letzte Methode erlaubt eindeutige Aussagen über die Reinheit der Probe und globuläre versus lineare Morphologie. Es wurden Präparate unter nicht-reduzierenden und reduzierenden Bedingungen hergestellt. Die Bilder (a) und (b) der Abbildung 4-8 zeigen die hohe Reinheit und Homogenität der Präparation von MalS.

4.2.1. MalS ist ein globuläres Protein

Anhand der Bilder (a) und (b) der Abbildung 4-8 konnte MalS als ein globuläres Molekül identifiziert werden. Durch die weitere Vergrößerung der Bilder (e) kann die Struktur von MalS als ein Hohlzylinder beschrieben werden, der an einer Seite geöffnet ist. Dadurch erscheint das Molekül in den zweidimensionalen Bildern in der Form eines Hufeisens.

Nach der Reduktion der Disulfidbrücken (Abbildung 4-8 (c)) aggregierte MalS. Die Reduktion der Disulfidbrücken in MalS führte zumindest zu teilweiser Denaturierung. Möglicherweise werden durch die Reduktion der Disulfidbrücken hydrophobe Segmente an der

¹ Die Elektronenmikroskopie von MalS wurde unter Anleitung von Prof. Dr. Eberhard Spiess (Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) am Deutschen Krebsforschungszentrum durchgeführt.

Proteinoberfläche exponiert, die zu intermolekularen Wechselwirkungen und damit zur Aggregation führen.

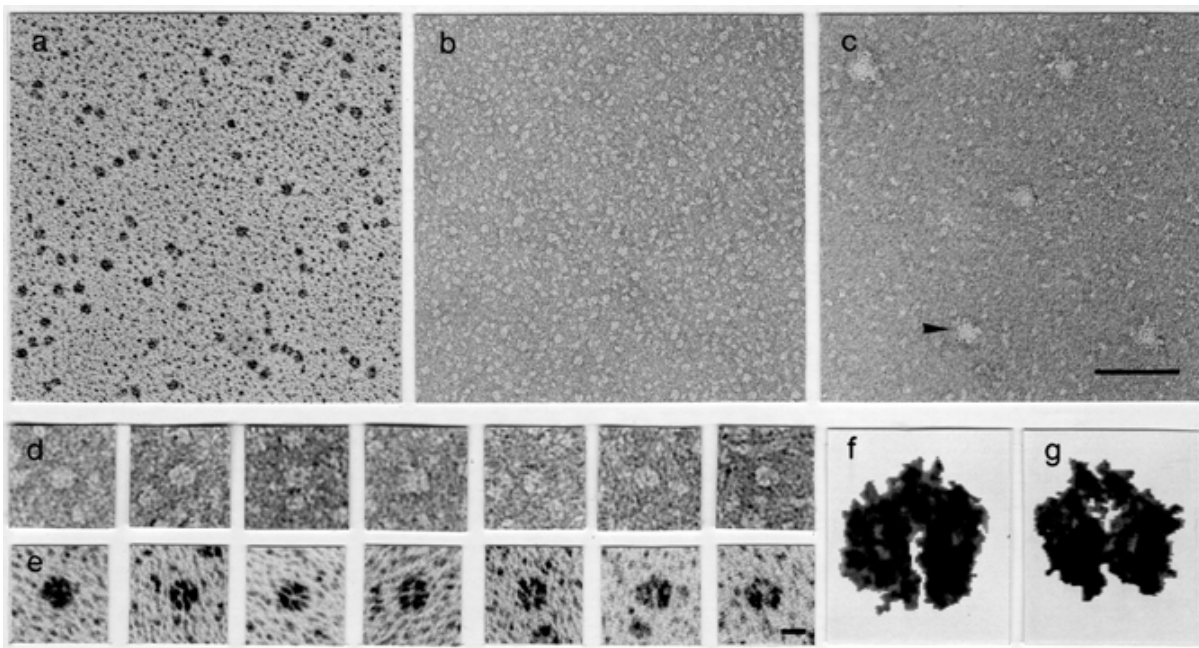


Abb. 4-8. Elektronenmikroskopie von nicht reduziertem und reduziertem MalS.

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie von isoliertem MalS wurden Präparate durch Glycerin-Sprüh-Präparation mit anschließender Pt/C-Schrägbedampfung (a) und Negativkontrastierung durch Uranylacetat (b, c) hergestellt. Nach der Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT (c) denaturierte MalS und bildete große Aggregate (Pfeilspitze). Die Bildserien zeigen ausgewählte Partikel aus negativkontrastierten (d) und schrägbedampften (e) Präparaten. Die letzten zwei Bilder der Serie (e) wurden durch Hintergrundelimination, Kontrastverstärkung und Übervergrößerung weiter verarbeitet (f) und (g). Die Marker in (c) und (e) entsprechen 100 bzw. 10 nm.

4.2.2 Bestimmung der Größe und des Molekulargewichts von MalS anhand der elektronenmikroskopischen Aufnahmen

Durch das Ausmessen von negativkontrastierten MalS-Partikeln konnten die Dimensionen von MalS bestimmt werden. Die Höhe des Zylinders beträgt $(80,5 \pm 0,88) \text{ \AA}$. Der komplette Durchmesser des Moleküls beträgt $(57,5 \pm 0,63) \text{ \AA}$ und der Durchmesser des inneren Hohlraumes $(23,0 \pm 0,43) \text{ \AA}$.

Anhand der Dimensionen von MalS konnte eine Abschätzung des Molekulargewichts durchgeführt werden. Bei einem partialspezifischen Volumen von $1,37 \text{ \AA}^3/\text{kDa}$ (Zipper et al., 1971) und einem Zylindervolumen von 117 \AA^3 errechnete sich ein Molekulargewicht von $85,4 \text{ kDa}$. Das theoretische Molekulargewicht von MalS beträgt $73,96 \text{ kDa}$. Die abgebildeten MalS-Partikel sind somit monomere Proteinmoleküle.

4.3 Kartierung der Disulfidbrücken in MaIS durch ESI-MS¹

MaIS enthält vier Cysteine. Ein Protein mit vier Cysteinen kann maximal zwei Disulfidbrücken ausbilden. Dabei gibt es theoretisch vier verschiedene Möglichkeiten. Durch massenspektrometrische Methoden konnte die Anzahl der Disulfidbrücken und die Verknüpfung der Cysteine bestimmt werden. Hierfür wurde MaIS unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen tryptisch verdaut. Die entstehenden Fragmente wurden durch eine HPLC aufgetrennt und deren Molekulargewicht durch die Elektrospray-Massenspektrometrie (ESI-MS) bestimmt. Aus diesen Experimenten (Spiess et al., 1997) läßt sich ableiten, daß Cystein-40 und Cystein-58 eine Disulfidbrücke bilden, und Cystein-104 und Cystein-520 miteinander verknüpft sind (Abbildung 4-9).

10	20	30	40	50	60	70	80
ASWTSFGFPA	FSEQQIGTFV	SHAQLPKGTR	PLITLNFDDQC	WQPADAIKLN	QMLSLQPCSN	TPPQWRLFRD	GEYTLQIDTR
90	100	110	120	130	140	150	160
SGTPTLMISI	QNAAEFVASL	VRECPKWDGL	PLITVDVSATF	PEGA AVR DYY	SQQIAIVKNG	QIMLQPAATS	NGLLLLERAE
170	180	190	200	210	220	230	240
TDTSAPEFDWH	NATVYFVLTD	RFENGDPNSD	QSYGRHKDGM	AEIGTFHGGD	LRGLTNKLDY	LQQLGVNALW	ISAPFEQIHG
250	260	270	280	290	300	310	320
WVGGGTKGDF	PHYAYHGYT	QDWINLDANM	GNEADLRITLV	DSAHQRGIRI	LFDVVMNHTG	YATLADMQEY	QFGALYLSGD
330	340	350	360	370	380	390	400
EVKKS LGERW	SDWKPAAGQT	WHSFN DYINF	SDKTGWDKWW	GKNWIRTDIG	DYDNP GFDDL	TMSLAFLPDI	KTESTTASGL
410	420	430	440	450	460	470	480
PVIFYKNKMDT	HAKAIDGYTP	RDYLTHWLSQ	WVRDYGIDGF	RVDTAKHVEL	PAWQQLKTEA	SAA LREWKKA	NPKALDDKP
490	500	510	520	530	540	550	560
FWMTGEAWGH	GVMQSDYYRH	GFDAMINFDY	QEQA AKAVDC	LAQMDTTWQQ	MAEKLQGFNV	LSYLS SHDTR	LFREGGDKAA
570	580	590	600	610	620	630	640
ELLLLAPGAV	QIFYGDESSR	PFGPTGSDPL	QGTRSDMNWQ	DVSGKSAASV	AHWQKISQFR	ARHPAIGAGK	QTLLLLKQGY
650	659						
GFVREHGDDK	VLVWVAGQQ						

Abb. 4-9. Aminosäuresequenz und Disulfidbrücken von MaIS.

Die Disulfidbrücke zwischen Cystein-40 und Cystein-58 und die zwischen Cystein-104 und Cystein-520 ist durch eine Linie symbolisch dargestellt.

Durch die Elektrospray-Massenspektrometrie konnte auch das tatsächliche Molekulargewicht von MaIS bestimmt werden (Spiess et al., 1997). Hierbei hat sich gezeigt, daß MaIS als Monomer vorliegt und außer den zwei Disulfidbrücken keine weiteren Modifikationen trägt. Die durch ESI-MS bestimmte Molekülmasse ($(73\,978 \pm 20)$ Da) weicht von der aus der Aminosäuresequenz berechneten Masse (73 961 Da) nur geringfügig ab. Dieses Ergebnis bestätigt den EM-Befund des monomeren Status von MaIS (Kapitel 4.2.2).

¹ Diese Experimente wurden von H. Peter Happersberger und Dr. Michael O. Glocker (Arbeitsgruppe Analytische Chemie der Universität Konstanz, Konstanz) durchgeführt. Das hierfür verwendete MaIS wurde von mir gereinigt.

4.4 Bestimmung des Molekulargewichtes von MalS durch analytische Ultrazentrifugation¹

Durch die Massenspektrometrie können nur kovalente Multimere beobachtet werden. Findet die Oligomerisierung von Proteinuntereinheiten durch andere Wechselwirkungen statt, werden die Multimere durch die Präparation zerstört. Um auch das Vorhandensein nicht kovalenter Multimere von MalS auszuschließen, wurde eine Molekulargewichtsbestimmung von MalS durch eine analytische Ultrazentrifugation durchgeführt. Die molekulare Masse von MalS konnte unter oxidierenden Bedingungen auf (70 ± 4) kDa bestimmt werden (Spiess et al., 1997). Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem errechneten Molekulargewicht eines Monomers und zeigt eindeutig, daß MalS bis in den mikromolaren Bereich als monomeres Protein vorliegt.

4.5 Charakterisierung der Faltung von MalS *in vivo*

Als Merkmal für eine korrekte Faltung von MalS *in vivo* wurde die Ausbildung von Disulfidbrücken und die enzymatische Aktivität herangezogen. Wenn beide Eigenschaften identisch mit denen des entsprechenden Wildtyp-Stammes waren, wurde von einer korrekten Faltung ausgegangen.

4.5.1 Die Faltung von MalS ist *in vivo* abhängig von dem Faltungshelfer DsbA

Die Ausbildung von Disulfidbrücken wird in der Zelle durch die periplasmatische Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA katalysiert (Bardwell et al., 1991). In Stämmen ohne DsbA können sich in vielen periplasmatischen Proteinen, wie z. B. alkalische Phosphatase (Derman und Beckwith, 1991) keine Disulfidbrücken ausbilden. Um zu untersuchen, ob DsbA auch einen Einfluß auf die Disulfidbrückenausbildung von MalS hat, wurde die MalS-Aktivität von Übernachtskulturen eines *dsbA*⁻-Stammes (CS6) bestimmt (Tabelle 47). *malS* wurde von dem Plasmid pUMa103 exprimiert.

Tab. 4-6. MalS-Aktivität in einer *dsbA*-Mutante.

Die MalS-Aktivität wurde mit dem Substrat PG-6 in ganzen Zellen gemessen. Die Kulturen wurden in M9-Medium (0,2 % Casaminosäuren) über Nacht bei der entsprechenden Temperatur angezogen. *malS* wurde von dem Plasmid pUMa103 exprimiert.

Stamm	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in nmol/min pro 10 ⁹ Zellen)	
		28 °C	37 °C
CS10	Wildtyp	3,1	2,0
CS6	<i>dsbA::kan</i>	1,8	0,1

Inkubiert man die Kultur bei 37 °C, ist die Ausbildung von Disulfidbrücken sehr gering. Nur 5 % der MalS-Aktivität des entsprechenden *dsbA*⁺-Stammes war meßbar. Eine Analyse

¹ Die Sedimentationsexperimente wurden von Dr. Karsten Rippe (Biophysik der Makromoleküle, Deutsches Krebsforschungszentrum, Heidelberg) mit von mir gereinigtem MalS durchgeführt.

durch einen Western-Transfer mit α -MalS-Antiserum zeigte, daß die MalS-Proteinmenge im Vergleich zum *dsbA*⁺-Stamm stark reduziert war (nicht gezeigt). Es konnte nur oxidiertes MalS nachgewiesen werden. Nach der Inkubation der Kultur bei 28 °C ist die Ausbildung der Disulfidbrücken wesentlich effizienter als bei 37 °C, und 58 % der Aktivität des entsprechenden *dsbA*⁺-Stammes konnten bestimmt werden. Auf einem Western-Transfer (nicht gezeigt) konnte ebenfalls kein reduziertes MalS nachgewiesen werden. Die Menge des oxidierten MalS entsprach dem Aktivitätsniveau.

4.5.2 Pulse-Chase-Experimente zum Studium der Kinetik der Disulfidbrückenbildung und der Stabilität von MalS in einer *dsbA::kan*-Mutante

Um die Stabilität von MalS in einem *dsbA::kan*-Stamm zu untersuchen, wurde ein Pulse-Chase-Experiment bei 28 °C und 37 °C durchgeführt. Die MalS-Menge wurde quantifiziert und so die Stabilität des synthetisierten Proteins bestimmt (Abbildung 4-10).

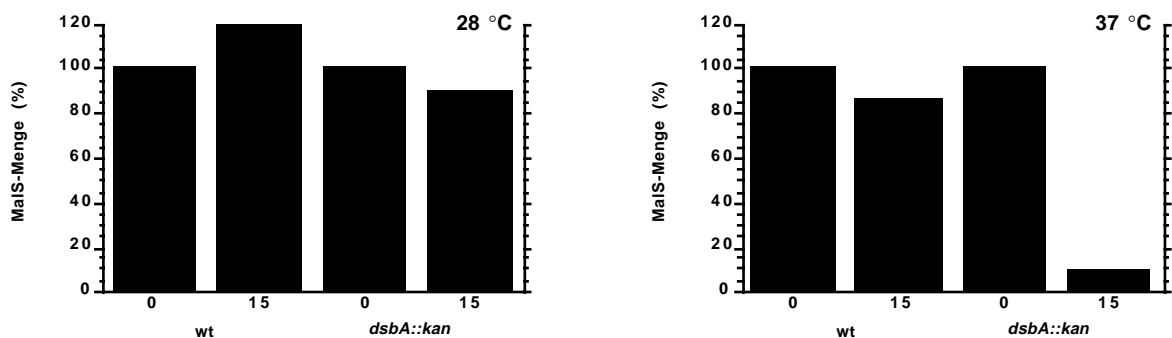


Abb. 4-10. Stabilität von MalS in einem *dsbA*⁺- und *dsbA*⁻-Stamm bei 28 °C und 37 °C.

Nach einem Pulse-Chase-Experiment mit den Stämmen CS10pUMa103 (*wt*) und CS6pUMa103 (*dsbA::kan*) bei 28 °C und 37 °C, wurde durch eine Immunpräzipitation mit α -MalS-Antiserum das MalS entzogen und durch eine nicht-reduzierende 10 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt. Nach der Autoradiographie des Gels ist die MalS-Menge quantifiziert worden. Bei der Proteinmenge des 28 °C-Experiments handelte es sich um oxidiertes MalS; beim 37 °C-Experiment im *dsbA*⁺-Stamm (*wt*) um oxidiertes, im *dsbA*⁻-Stamm (*dsbA::kan*) um reduziertes MalS. Auf der Ordinate ist die MalS-Menge (in %) relativ zur Menge im Chase des jeweiligen Stammes aufgetragen.

In einem *dsbA*⁺-Stamm finden der Export von MalS in das Periplasma und die Disulfidbrückenbildung in Sekunden statt. Das Protein ist stabil, da es innerhalb des 15-minütigen Chase nicht abgebaut wurde. Die Inkubationstemperatur hatte keinen Einfluß auf die Faltung und Stabilität des Proteins. In einem *dsbA*⁻-Stamm konnte dagegen ein Unterschied beobachtet werden. Bei 37 °C war MalS instabil. Eine Disulfidbrückenausbildung fand nicht statt, und MalS ohne Disulfidbrücken wurde innerhalb von Minuten abgebaut. Führt man das Experiment bei 28 °C durch, konnte eine Fraktion von MalS oxidieren. MalS mit ausgebildeten Disulfidbrücken war stabil. Der Anteil an oxidiertem MalS war jedoch nicht vergleichbar mit der Menge an oxidiertem MalS in einer Übernachtskultur. In einer solchen Kultur eines *dsbA*⁻-Stammes wurden 50 % der Menge des entsprechenden *dsbA*⁺-Stammes nachgewiesen, durch das Pulse-Chase-Experiment jedoch nur 20 %. Dies legt nahe, daß eine Akkumulation von oxidiertem MalS im *dsbA*⁻-Stamm stattfand. Die Ausbildung von Disulfidbrücken in einem *dsbA*⁻-Stamm ist somit auch bei 28 °C wesentlich langsamer als in einem *dsbA*⁺-Stamm.

4.5.3 Die korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS ist unabhängig von der Disulfidbrücken-Isomerase DsbC

Die Faltung von MalS in Abhängigkeit der Disulfidbrücken-Isomerase DsbC konnte durch die Konstruktion des Stammes CS46 studiert werden. In diesem Stamm ist das *dsbC*-Gen durch ein Transposon unterbrochen. Die MalS-Aktivität war in dem *dsbC*-Stamm CS46pUMa103 im Vergleich zu dem entsprechenden *dsbC*⁺-Stamm CS10pUMa103 nicht reduziert (Tabelle 4-7). Auf einem Western-Transfer (nicht gezeigt), der mit α -MalS-Antiserum entwickelt wurde, konnte nur oxidiertes MalS nachgewiesen werden. Die MalS-Menge war im *dsbC*-Hintergrund im Vergleich zum *dsbC*⁺-Hintergrund nicht reduziert. Die Ausbildung der Disulfidbrücken durch DsbA fand folglich in der richtigen Verknüpfung statt. Eine Isomerisierung durch DsbC war nicht notwendig.

Tab. 4-7. MalS-Aktivität in einer *dsbC*-Mutante.

Die MalS-Aktivität wurde mit dem Substrat PG-6 in ganzen Zellen gemessen. Die Kulturen wurden in M9-Medium (0,2 % Casaminosäuren) bei 28 °C angezogen. *malS* wurde von dem Plasmid pUMa103 exprimiert.

Stamm	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in nmol/min pro 10 ⁹ Zellen)
CS10pUMa103	Wildtyp	3,1
CS46pUMa103	<i>dsbC::miniTn10kan</i>	3,3

4.5.4 Die Prolinisomerase FkpA hat keinen Einfluß auf die Faltung von MalS

Eine Deletion der Prolinisomerase PPIA wirkte sich nicht, jedoch die potentielle Prolinisomerase SurA drastisch, auf die Faltung von MalS aus (Spiess, 1995). Zusätzlich sollte nun noch eine weitere im Periplasma bekannte Prolinisomerase, FkpA, getestet werden. In dem Stamm CS71 ist das *fkpA*-Gen durch eine Chloramphenicolkassette unterbrochen, wodurch kein funktionelles FkpA in der Zelle vorliegen kann. Die Tabelle 4-8 zeigt, daß dies keinen Einfluß auf die Faltung von MalS hatte. Die MalS-Aktivität in einem *fkpA*⁺- und *fkpA*⁻-Stamm war identisch.

Tab. 4-8. MalS-Aktivität in einer *fkpA*-Mutante.

Die Kulturen wurden in M9-Medium (0,2 % Casaminosäuren) bei 37 °C angezogen. *malS* wurde von dem Plasmid pUMa103 exprimiert. Die MalS-Aktivität wurde mit dem Substrat PG-6 in ganzen Zellen gemessen und erfolgte in unabhängigen Doppelpellets, wobei der Unterschied 10 % betrug.

Stamm	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in nmol/min pro 10 ⁹ Zellen)
CS10pUMa103	Wildtyp	2,3
CS71pUMa103	<i>fkpA::cm</i>	2,3

4.5.5 Die Identifikation der Protease, die falsch gefaltetes MalS abbaut

Die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die Faltung von MalS ist *in vivo* abhängig von der Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA. Stämme ohne das DsbA-Protein haben eine

verringerte MalS-Menge (Kapitel 4.5.1), da reduziertes MalS schnell und effizient von der Zelle abgebaut wird (Kapitel 4.5.2). Um die für diesen Abbau verantwortliche Protease zu identifizieren, wurden zusätzlich zu dem *dsbA*-Gen noch die Gene von verschiedenen Proteasen ausgeschaltet.

4.5.5.1 Falsch gefaltetes MalS wird durch die Protease DegP abgebaut

Der konstruierte Stamm CS49 ist eine Doppelmutante: neben dem *dsbA*-Gen ist auch das Gen der Protease DegP ausgeschaltet. Die Experimente mit diesem Stamm konnten nur bei 28 °C durchgeführt werden, da die Bakterienzelle ohne die Protease DegP temperatursensitiv ist und ab einer Temperatur von 37 °C nicht mehr wachsen kann. In der *dsbA-degP*-Doppelmutante wurde MalS in seiner reduzierten Form stabilisiert. Es konnte kein oxidiertes MalS auf einem Western-Transfer (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden, und eine MalS-Aktivität war nicht meßbar. Durch die Deletion der Protease DegP wurde ein Abbau von reduziertem MalS in einem *dsbA*-Stamm verhindert. Gleichzeitig wurde damit jedoch die Ausbildung von Disulfidbrücken in MalS bei 28 °C und damit eine Faltung unterbunden. Die Protease DegP scheint somit nicht nur am Abbau von falsch gefalteten MalS involviert, sondern auch – direkt oder indirekt – an der *de novo* Faltung von MalS in einem *dsbA*-Stamm beteiligt zu sein.

Neben der Proteasefunktion könnte DegP auch eine Chaperonfunktion besitzen. Durch diese wäre es DegP möglich, bei der Ausbildung von Disulfidbrücken in MalS in Abwesenheit von DsbA zu assistieren und eine Faltung in die enzymatisch aktive Konformation herbeizuführen. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden *malS* und ein *degP*-Derivat mit einer Mutation im aktiven Zentrum koexprimiert (Kapitel 4.5.7).

4.5.5.2 DegQ und DegS sind nur gering am Abbau von falsch gefaltetem MalS beteiligt

In *E. coli* gibt es noch zwei zu DegP homologe Proteasen: DegQ und DegS (Bass et al., 1996). In einer *dsbA-degQ-degS*-Mutante waren, auf einem mit α -MalS-Antiserum entwickelten Western-Transfer (nicht gezeigt), neben geringen Mengen an reduziertem MalS auch oxidiertes MalS nachweisbar. DegQ und DegS sind somit wesentlich geringer am Abbau von falsch gefaltetem MalS beteiligt als DegP. Die enzymatische Aktivität von MalS in diesem Stamm war nicht reduziert und entsprach dem reinen *dsbA*-Stamm (Daten nicht gezeigt). In einem *dsbA-degP-degQ-degS*-Stamm war keine enzymatische Aktivität mehr nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

Einen Einfluß auf die Faltung von MalS scheinen DegQ und DegS nicht zu haben. In ihrer Abwesenheit konnte MalS in einem *dsbA*-Stamm noch Disulfidbrücken ausbilden, und eine Faltung in die enzymatisch aktive Konformation war möglich.

4.5.6 In einem *dsbA*⁺-Stamm ist die Faltung von MalS nicht auf DegP angewiesen

Nachdem in einem *dsbA*⁻-Hintergrund ein starker Effekt auf die Disulfidbrückenausbildung und damit auf die Faltung von MalS zu beobachten war (Kapitel 4.5.5.1), wurde untersucht, ob dieser Einfluß auch in einem *dsbA*⁺-Stamm auftritt. Hierfür wurde der Stamm CS28 (*degP::kan*) konstruiert. Die MalS-Aktivität in Ganzzellen von Übernachtskulturen der Stämme CS10pUMa103 und CS28pUMa103 wurde bestimmt und ist in der Tabelle 4-9 aufgeführt.

Tab. 4-9. MalS-Aktivität in einem *degP*-Stamm.

Die MalS-Aktivität wurde durch drei voneinander unabhängigen Messungen mit dem Substrat PG-6 in ganzen Zellen bestimmt, wobei die Abweichung 3 % betrug. Die Kulturen sind im M9-Medium (0,2 % Casaminsäuren) bei 28 °C angezogen worden. *malS* wurde von dem Plasmid pUMa103 exprimiert.

Stamm	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in nmol/min pro 10 ⁹ Zellen)
CS10pUMa103	Wildtyp	2,8
CS28pUMa103	<i>degP::kan</i>	2,8

Die Aktivität von MalS war in beiden Stämmen identisch. DegP hatte in Anwesenheit von DsbA keinen Einfluß auf die Faltung von MalS. Die Faltung von MalS *in vivo* wurde nur bei Faltungsstreß durch DegP unterstützt.

4.5.7 Der Einfluß von DegP_{S210A} auf die Faltung von MalS

Um die Bedeutung von DegP für die Faltung von MalS zu studieren, wurde das Plasmid pCS10 kloniert. Auf dem Plasmid befindet sich ein *degP*-Gen mit einer Mutation im aktiven Zentrum. Die Aminosäure 210 des reifen Proteins ist von Serin nach Alanin ausgetauscht worden. Das DegP-Derivat hat dadurch keine enzymatische Aktivität mehr (Kapitel 4.6.9.2) (Skórko-Glonek et al., 1995b). Die Sekundärstruktur von DegP ist durch die Mutation nicht beeinflusst (Skórko-Glonek et al., 1995a). Das Plasmid pCS10 ist aufgrund einer anderen Antibiotikaresistenz und eines unterschiedlichen Replikationsursprungs kompatibel zu dem Plasmid pUMa103. Dadurch waren *malS* und *degP*_{S210A} koexprimierbar.

4.5.7.1 DegP_{S210A} unterstützt die Faltung von MalS in einem *dsbA*-*degP*-Stamm

In einer *dsbA*-*degP*-Doppelmutante konnte MalS keine Disulfidbrücken mehr ausbilden, wurde aber nicht mehr proteolytisch beseitigt. Wurde in dieser Mutante nun *degP* in Form seines Derivates *degP*_{S210A} wieder exprimiert, war eine Faltung von MalS wieder möglich. Die Ausbildung von Disulfidbrücken war ermöglicht, und eine enzymatische Aktivität war meßbar. Auf ein Aufführen der Daten ist verzichtet worden, da die Ergebnisse von Kapitel 4.5.7.2 diese enthalten.

4.5.7.2 Die Aggregation von MalS in einer *dsbA*-*degP*-Mutante wird durch die Expression von *degP*_{S210A} wieder aufgehoben

Korrekt gefaltetes MalS liegt im Periplasma in löslicher Form vor, da das Protein durch einen kalten osmotischen Schock freigesetzt wird. Reduziertes MalS aggregiert und ist unlöslich (Kapitel 4.1.2.7 und 4.2.1). Um zu prüfen, ob MalS in den verschiedenen Faltungshelfer-Mutanten in löslicher Form vorliegt, wurden kalte osmotische Schocks durchgeführt. Hierbei werden die Zellen erst mit hoher Osmolarität behandelt und dann schlagartig in sehr niedrige Osmolarität überführt. Dadurch bekommt die Außenmembran Löcher, und die löslichen Komponenten des Periplasmas werden durch eine Ausdehnung des Cytoplasmas freigesetzt. Nach einer Zentrifugation findet man im Überstand die löslichen periplasmatischen Proteine und im Sediment die unlöslichen periplasmatischen Proteine, die Membranfraktion und das Cytoplasma. Der kalte osmotische Schock wurde mit Zellen durchgeführt, die bei 28 °C

gewachsen waren. Beide Fraktionen wurden durch eine SDS-PAGE aufgetrennt. Nach einem Western-Transfer ist der Disulfidbrückenstatus von MalS mit α -MalS-Antiserum analysiert worden (Abbildung 4-11).

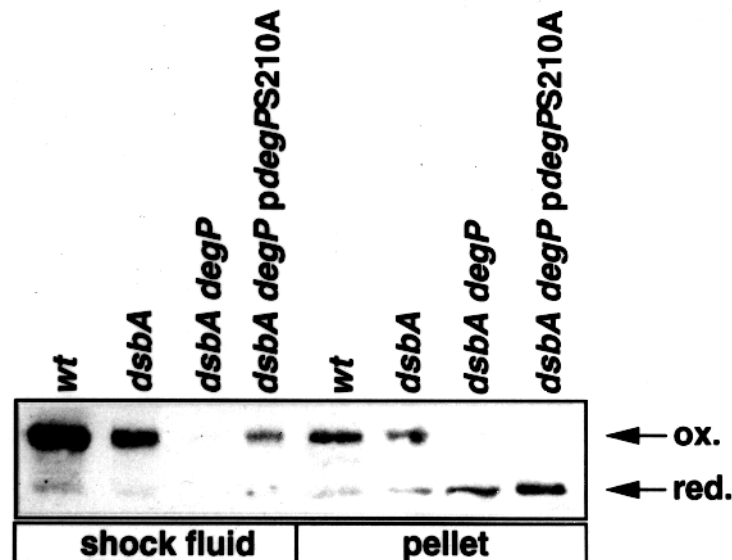


Abb. 4-11. Löslichkeit von MalS in verschiedenen *dsbA*⁻- und *degP*-Mutanten.

Western-Transfer der periplasmatischen (shock fluid) und Pelletfraktion (pellet) von osmotisch geschockten Zellen (Kapitel 4.8.4.1). Die Zellen wurden über Nacht in M9-Medium gezogen, das mit 0,2 % Casaminsäuren versetzt war. Die Stämme CS10 (wt), CS6 (*dsbA*), CS49 (*dsbA degP*) und CS49pCS10 (*dsbA degP pdegP_{S210A}*) exprimierten *malS* von dem Plasmid pUMa103 und *degP_{S210A}* vom Plasmid pCS10. Zum Nachweis von MalS wurde polyklonales Antiserum gegen MalS eingesetzt. Die Laufhöhe der oxidierten (ox.) und reduzierten (red.) Form von MalS ist durch einen Pfeil markiert.

In der löslichen Fraktion eines Stammes CS10 konnte nur oxidiertes MalS nachgewiesen werden. Das oxidierte MalS in der unlöslichen Fraktion könnte auf einem unvollständigen Aufschluß der Zellen beruhen. In der *dsbA*⁻-Mutante CS6 war ebenfalls nur oxidiertes MalS nachweisbar. Die Gesamtproteinmenge war jedoch reduziert im Vergleich zum Stamm CS10. In der *dsbA degP*⁻-Mutante CS49 lag nur reduziertes MalS vor. Es war komplett in der unlöslichen Fraktion. Nach der Expression der *degP_{S210A}*-Punktmutante in diesem Stamm, wurde das oxidierte MalS in der löslichen Fraktion gefunden. Eine weitere Fraktion konnte keine Disulfidbrücken ausbilden und war unlöslich.

Dieses Experiment unterstützt die Hypothese, daß DegP zu seiner Proteasefunktion auch eine Chaperonfunktion aufweist: eine Aggregation von MalS wird verhindert, wodurch eine langsame Ausbildung der Disulfidbrücken möglich ist, und MalS faltet in eine enzymatisch aktive Konformation.

Zusätzlich wurde die enzymatische Aktivität der Periplasmaextrakte relativ zu dem des Stammes CS10 bestimmt. Die Aktivitäten sind in der Tabelle 4-10 zusammengefaßt.

Tab. 4-10. MalS-Aktivitäten in den Periplasmaextrakten von *dsbA*⁻- und *dsbA*⁻*degP*⁻-Mutanten.

Kulturen der stationären Wachstumsphase, die bei 28 °C im M9-Medium mit 0,2 % CA gewachsenen waren, wurden einem kalten osmotischen Schock (Kapitel 3.8.4.1) unterzogen. Eine Zellzahl von $1,8 \times 10^{10}$ Zellen wurde hierfür mit 10 ml 0,5 mM CaCl₂ geschockt. Die Expression von *malS* erfolgte von dem Plasmid pUMa103 und die von *degP*_{S210A} von dem Plasmid pCS10. Zur Bestimmung der MalS-Aktivität wurde die Schock-Lösung mit 100 mM Tris/HCl, pH 8,7 gepuffert und durch die Zugabe von PG-6 zu einer Konzentration von 2 mM bei Raumtemperatur bestimmt.

Periplasmaextrakt des Stammes	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in %)
CS10pUMa103	Wildtyp	100
CS6pUMa103	<i>dsbA::kan</i>	50
CS49pUMa103	<i>dsbA::kan degP::Tn10</i>	5
CS49pCS10pUMa103	<i>dsbA::kan degP::Tn10 pdegP</i> _{S210A}	30

Die prozentualen Aktivitäten in den Extrakten korrelieren mit den in Ganzzellen bestimmten MalS-Aktivitäten (Spiess et al., 1999). Dies zeigte, daß lösliches MalS, das durch den osmotischen Schock freigesetzt wurde, vollständig enzymatisch aktiv ist.

4.5.8 Bestimmung der *degP*-Expression unter Streßbedingungen durch eine transkriptionale *degP-lacZ*-Fusion

4.5.8.1 Die Zelle erkennt falsch gefaltetes MalS

Die Expression von *degP* wird in Mutanten mit Defekten in der Proteinfaltung induziert. Falsch gefaltetes MalS wird in der Zelle durch DegP abgebaut. Kann die Zelle aber auch die Expression von *degP* an das Auftreten von falsch gefaltetem MalS anpassen, oder ist die Expression von *degP* unabhängig vom Auftreten von falsch gefaltetem MalS? Kann eine Chaperonaktivität von DegP einen positiven Einfluß auf die Löslichkeit oder den Faltungszustand von den periplasmatischen Proteinen ausüben und dadurch die durch SigmaE und CpxAR vermittelte Streßantwort reduzieren?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde die *degP*-Promotoraktivität untersucht. Die Transkriptionssteigerung des *degP*-Gens kann über die Aktivität der β -Galaktosidase einer *degP-lacZ*-Promotorfusion gemessen werden. Die Bestimmung erfolgte aus Bakterienkulturen der stationären Wachstumsphase. Die Meßdaten sind in der Tabelle 4-11 aufgelistet.

Die Expression von *malS* im Stamm PND2000 erhöhte nicht die β -Galaktosidase-Aktivität. Ein leichter Anstieg war im Stamm CS50 (*dsbA::kan*) zu verzeichnen (133 %). Eine deutliche Zunahme fand nach der Expression von *malS* in diesem Stamm statt (175 %). Nach der Koexpression von *malS* und *degP*_{S210A} sank die Aktivität wieder auf einen Wert (74 %), der nur geringfügig über dem des Stammes ohne Expression von *malS* liegt. In dem Stamm CS77 (*degP::Tn10*) war keine Veränderung im Vergleich zum Stamm PND2000 zu verzeichnen. Auch nach der Expression von *malS* konnte keine Zunahme der Aktivität verzeichnet werden. DegP scheint bei 28 °C unter Bedingungen ohne Faltungsstreß keine große Bedeutung zu haben. In der Doppelmutante CS78 (*dsbA::kan degP::Tn10*) war die β -Galaktosidase-Aktivität (150 %) höher als in der *dsbA*-Mutante CS50 (133 %). Die Expression von *malS* steigerte die β -Galaktosidase-Aktivität auf einen Wert, der über dem der

dsbA-Mutante liegt (188 %). Nach einer Koexpression von *malS* und *degP*_{S210A} war die Aktivität wieder reduziert (181 %). Dies ist ein weiterer Hinweis, daß DegP für die Faltung von MalS unter Streßbedingungen erforderlich ist.

Tab. 4-11. β -Galaktosidase-Aktivität einer transkriptionalen *degP-lacZ*-Fusion in verschiedenen Stämmen.

Die Aktivität der β -Galaktosidase von Stämmen mit einer chromosomalen *degP-lacZ*-Fusion wurde nach dem Wachstum der Kultur in die frühe logarithmische Phase bei 28 °C in M9-Medium, das mit 0,2 % Glycerin, 0,4 % Maltose und 0,01% Thiamin versetzt war, bestimmt. In Stämmen, die das Plasmid pUMa103 trugen, wurde *malS* überexprimiert. Die Expression von *degP*_{S210A} fand vom Plasmid pCS10 statt. Die Bestimmung wurde in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt und die Ergebnisse gemittelt. Eine Aktivität von 100 % entspricht 1,0 μ mol hydrolysiertem ONPG pro Minute und mg zellulärem Protein.

Stamm	relevanter Genotyp	β -Galaktosidase-Aktivität (in %)
PND2000	λ [<i>degP-lacZ</i>]	100
PND2000pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] p <i>degP</i> _{S210A}	42
PND2000pUMa103	λ [<i>degP-lacZ</i>] p <i>malS</i>	74
PND2000pUMa103pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] p <i>malS</i> p <i>degP</i> _{S210A}	34
CS50	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>dsbA::kan</i>	133
CS50pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>dsbA::kan</i> p <i>degP</i> _{S210A}	54
CS50pUMa103	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>dsbA::kan</i> p <i>malS</i>	175
CS50pUMa103pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>dsbA::kan</i> p <i>malS</i> p <i>degP</i> _{S210A}	74
CS77	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i>	105
CS77pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> p <i>malS</i>	60
CS77pUMa103	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> p <i>degP</i> _{S210A}	80
CS77pUMa103pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> p <i>malS</i> p <i>degP</i> _{S210A}	46
CS78	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> <i>dsbA::kan</i>	150
CS78pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> <i>dsbA::kan</i> p <i>degP</i> _{S210A}	34
CS78pUMa103	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> <i>dsbA::kan</i> p <i>malS</i>	188
CS78pUMa103pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>degP::Tn10</i> <i>dsbA::kan</i> p <i>malS</i> p <i>degP</i> _{S210A}	81

In Situationen, in denen MalS nicht richtig falten konnte, wurde die Expression von *degP* gesteigert. Das proteolytisch inaktive Protein DegP_{S210A} konnte den Faltungsstreß unter diesen Bedingungen für die Zelle reduzieren. Aber auch in der Abwesenheit von falsch gefaltetem MalS verminderte DegP_{S210A} die *degP*-Promotoraktivität. Die Chaperonaktivität von DegP ist somit allgemein für periplasmatische Proteine von Bedeutung.

Diese Experimente zeigen, daß die Zelle falsch gefaltete Proteine erkennen kann und die Expression von *degP* daran anpaßt. DegP kann nicht nur den Faltungsstreß für die Zelle durch den Abbau von falsch gefalteten Proteinen reduzieren, sondern auch die Funktion eines Chaperons übernehmen, um Proteinen in Situationen mit Faltungsproblemen zu helfen.

4.5.8.2 Die Reduktion des Faltungsstreß im Periplasma durch DegP_{S210A} wird nicht nur über den CpxA/R-Weg registriert

Das Auftreten von Faltungsstreß im Periplasma kann über zwei voneinander unabhängige Signaltransduktionswege, dem CpxA/R-Zweikomponentensystem und dem RseA/B-System, registriert werden (Kapitel 2.5.2). Beide Wege kontrollieren auch die *degP*-Expression. In Zellen, die durch eine Mutation eine konstitutive CpxA-Aktivität aufweisen, ist die Streßantwort und somit die *degP*-Expression ständig angedreht. Eine solche Mutation ist z. B. der *cpxA9*-Genotyp. Die konstitutive Kinaseaktivität von CpxA führt zu einer ständigen Phosphorylierung des CpxR, wodurch der Transkriptionsaktivator permanent aktiv ist. Die β -Galaktosidase-Aktivität in einem *cpxA9*-Stamm vor und nach der Expression von *degP*_{S210A} ist in der Tabelle 4-12 aufgeführt.

Tab. 4-12. β -Galaktosidase-Aktivität einer *degP-lacZ*-Fusion in einer *cpxA9*-Mutante.

Die Aktivität der β -Galaktosidase von Stämmen mit einer chromosomalen *degP-lacZ*-Fusion wurde nach dem Wachstum in die stationäre Phase bei 28 °C im M9-Medium, das mit 0,2 % Glycerin, 0,4 % Maltose und 0,01% Thiamin versetzt war, bestimmt. Die Expression von *degP*_{S210A} fand vom Plasmid pCS10 statt. Die Bestimmung wurde in zwei unabhängigen Ansätzen durchgeführt, wobei die Abweichung < 5 % war. Eine Aktivität von 100 % entspricht 1,4 μ mol hydrolysiertem ONPG pro Minute und mg zellulärem Protein.

Stamm	relevanter Genotyp	β -Galaktosidase-Aktivität (in %)
PND2000	λ [<i>degP-lacZ</i>]	100
PND2000pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] p <i>degP</i> _{S210A}	67
CS79	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>cpxA9</i>	194
CS79pCS10	λ [<i>degP-lacZ</i>] <i>cpxA9</i> p <i>degP</i> _{S210A}	127

Die β -Galaktosidase-Aktivität war in dem *cpxA9*-Stamm CS79 im Vergleich zum Stamm PND2000 stark erhöht (~ 100 %). Die Expression von *degP*_{S210A} führte im Stamm PND2000 zu einer leichten (~ 30 %) und im Stamm CS79 zu einer drastischen Reduktion (~ 70 %) der β -Galaktosidase-Aktivität. Auch in einem *cpxA9*-Stamm wird die *degP*-Expression reduziert. Durch DegP_{S210A} wird somit der Faltungsstreß für die Zelle reduziert, und die Streßantwort kann abgedreht werden. DegP_{S210A} vermindert nicht nur spezifisch den Faltungsstreß, der nur über den CpxA/R-Weg registriert und beantwortet wird, sondern auch allgemein, da in einem *cpxA9*-Stamm die Streßantwort abgedreht wird. Die Signaltransduktion muß hierbei über den RseA/B-Weg erfolgen.

4.5.8.3 Die *degP*-Expression wird nicht durch eine hohe Osmolarität oder einen niedrigen pH-Wert des Mediums verändert

Das Periplasma steht in einem ständigen Austausch mit dem umgebenden Medium. Durch eine Änderung des Mediums kann dadurch auch ein Einfluß auf die Verhältnisse im Peri-

plasma genommen werden. Ein niedriger pH-Wert oder eine hohe Osmolarität könnten die Proteinfaltung beeinflussen und zu einer Induktion der *degP*-Transkription führen. Deshalb wurde der Effekt eines sauren pH-Wertes (pH 5,8) und erhöhter Osmolarität (300 mM und 500 mM) auf das Wachstum und die *degP*-Expression eines *degP*⁺- und *degP*⁻-Stammes anhand der *degP-lacZ*-Fusion untersucht (Abbildung 4-12). Die Erhöhung der Osmolarität ist durch Zugabe von NaCl zu dem LB-Medium herbeigeführt worden. Der pH-Wert war in diesem Experiment durch die Zugabe einer Puffersubstanz konstant gehalten worden (Watson et al., 1992). Als Referenz diente ein Ansatz, der auf pH 7,6 gepuffert war und kein zusätzliches NaCl enthielt.

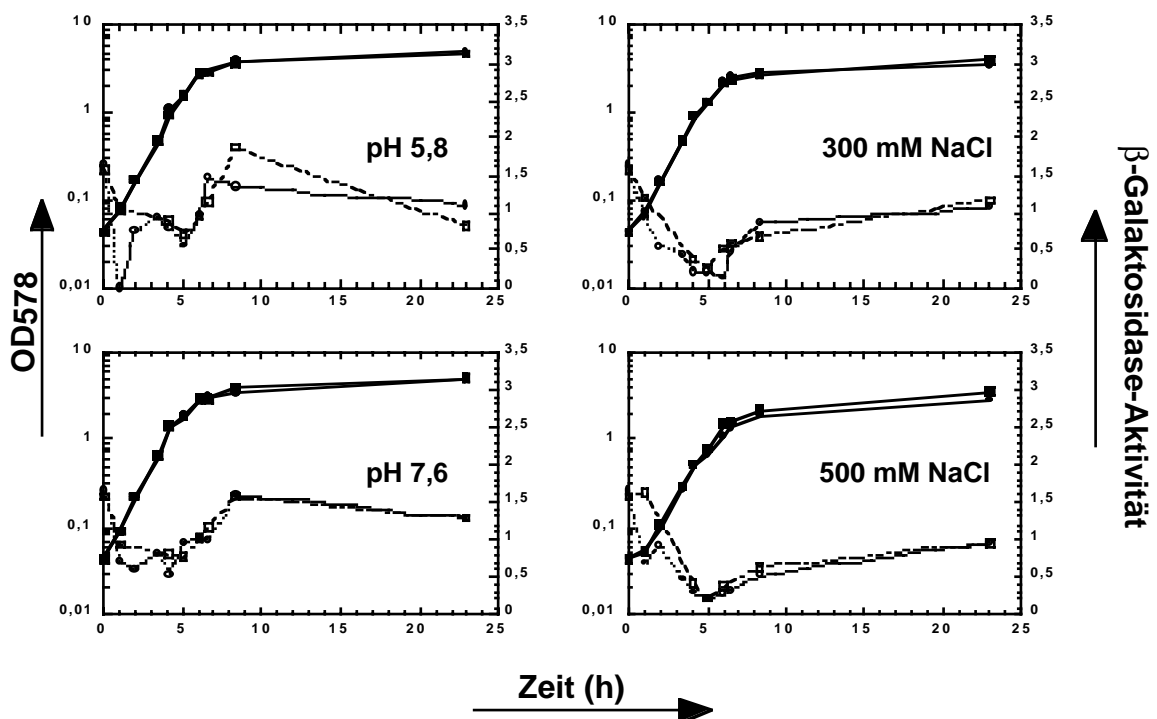


Abb. 4-12. Wachstumskurve und β -Galaktosidase-Aktivität der *degP-lacZ*-Fusion von den Stämmen PND2000 und CS77.

Eine Stationärphasenkultur der Stämme PND2000 (●,○) und CS77 (■,□) wurde 1:100 in vorgewärmtes (28 °C) LB-Medium mit dem entsprechenden Zusatz verdünnt. Der pH-Wert wurde durch Zugabe von MES, pH 5,8 bzw. MOPS, pH 7,6 zu einer Endkonzentration von 100 mM eingestellt. Die Bestimmung der OD₅₇₈ (durchgezogene Linie) und die β -Galaktosidase-Aktivität der *degP-lacZ*-Fusion (gestrichelte Linie) erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten. Die β -Galaktosidase-Aktivität ist in μmol hydrolysiertem ONPG pro Minute und mg zellulärem Protein angegeben. Die Kurven resultieren aus Einzelbestimmungen.

Das Wachstumsverhalten eines *degP*⁺- und *degP*⁻-Stammes war in den gleichen Medien identisch. Der pH-Wert hatte keinen Einfluß auf das Wachstum, und es wurde die gleiche Zellzahl in der ausgewachsenen Kultur erreicht (ca. 5×10^9 Zellen pro ml). Mit steigender Osmolarität des Mediums nahm die Zellzahl der ausgewachsenen Kultur ab. Bei der Zugabe von 500 mM NaCl wurden nur noch ca. 60 % der Zellzahl des Ansatzes ohne zusätzliche NaCl-Zugabe erreicht.

Der pH-Wert führte nicht zu einer Veränderung der *degP*-Transkription. Während der lag-Phase und frühen logarithmischen Wachstumsphase fiel die erhöhte β -Galaktosidase-Aktivität der Übernachtskultur unabhängig vom pH-Wert auf ungefähr 60 % ab. Während der

logarithmischen Wachstumsphase blieb die Aktivität konstant. Kurz vor dem Erreichen der stationären Phase stieg die β -Galaktosidase-Aktivität wieder an. Bei erhöhter Osmolarität im Wachstumsmedium war die *degP*-Transkription in der logarithmischen Phase wesentlich niedriger als bei der Kontrolle ohne NaCl-Zugabe. Nur 30 % der Aktivität der Übernachtskultur wurden gemessen. Der Abfall der β -Galaktosidase-Aktivität zu Beginn der logarithmischen Phase und der Anstieg beim Erreichen der stationären Wachstumsphase war langsamer im Vergleich zur Kontrolle ohne NaCl. Ein Unterschied in der *degP*-Transkription zwischen einem *degP*⁺- und *degP*⁻-Stamm konnte weder in der Abhängigkeit des pH-Wertes noch bei einer erhöhten Osmolarität festgestellt werden.

Ein saurer pH-Wert oder eine erhöhte Osmolarität des Wachstumsmediums wirken auf die Proteinfaltung nicht so negativ, daß eine Unterstützung der Proteinfaltung oder ein Abbau falsch gefalteter Proteine durch DegP eingeleitet werden muß. Die *degP*-Expression wird unter diesen Bedingungen nicht angedreht.

4.5.9 Faltung von MalS im Cytoplasma

Das Cytoplasma ist ein reduzierendes Milieu. Die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen ist nur unter Bedingungen möglich, die das Cytoplasma in ein mehr oxidierendes Milieu verwandeln. Eine Möglichkeit dies durchzuführen, ist Proteine, die beim Aufrechterhalten des reduzierenden Milieus beteiligt sind, zu eliminieren. Nachdem bislang nur die Faltung von MalS im Cytoplasma von *trxB*⁻ oder *gsh*⁻-Stämmen bei 37 °C untersucht war (Spiess et al., 1997), wurde die Faltung noch in Stämmen analysiert, die ein noch oxidierendes Cytoplasma haben. Da die Ausbildung von Disulfidbrücken im Periplasma in Abwesenheit von DsbA von der Temperatur abhängig ist, wurde die Faltung im Cytoplasma bei 28 °C und 37 °C studiert. Die Expression von *mals* ohne seine Signalsequenz erfolgte von dem Plasmid pCS13. Auf diesem Plasmid befindet sich ein signalsequenzloses *mals*-Derivat unter Kontrolle des P_{tac}-Promotors. Als Stämme für die Expression wurden neben dem Stamm DHB4 die DHB4-Mutanten i) WP597 (*trxB::kan...Tn10*), ii) FA112 (*gshA::kan trxB::kan...Tn10*) und iii) FA113 (*trxB::kan gor522...Tn10*) ausgewählt. Die Faltung von MalS im Periplasma in Abwesenheit von DsbA ist auf DegP angewiesen. Deshalb wurde zusätzlich noch untersucht, ob die Koexpression mit Δ *ssdegP*_{S210A}, einem signalsequenzlosen Derivat von *degP*_{S210A}, eine Faltung von MalS im Cytoplasma unterstützt. Von ausgewachsenen Kulturen, die bei 28 °C und 37 °C inkubiert waren, wurde eine MalS-Aktivitätsbestimmung (Tabelle 4-13) durchgeführt und der Status der Disulfidbrückenbildung auf einem Western-Transfer (Abbildung 4-13) untersucht. Der Nachweis von MalS auf dem Western-Transfer erfolgte mit α -MalS-Antiserum.

Im Vergleich zu dem periplasmatisch exprimierten MalS war nur ca. 1 % des MalS im Cytoplasma enzymatisch aktiv. Die Unterschiede in den Aktivitäten der einzelnen Stämme sind deshalb auch marginal. Dennoch ließ sich ein Anstieg der MalS-Aktivität in dem Stamm FA113 beobachten. Die enzymatische Aktivität von MalS war in diesem Stamm, im Vergleich zum Stamm DHB4, verdoppelt. Die Koexpression mit einem signalsequenzlosen *degP*_{S210A}-Derivat hatte keine positiven Auswirkungen auf die Aktivität und unterstützte damit nicht die Faltung von MalS im Cytoplasma.

Tab. 4-13. MalS-Aktivität eines signalsequenzlosen Derivats in verschiedenen Mutanten nach dem Wachstum bei 28 °C und 37 °C.

Die Aktivitätsbestimmungen wurden von Kulturen der stationären Phase gemacht, die in LB-Medium mit 50 µM IPTG bei der entsprechenden Temperatur gewachsen waren. Die MalS-Aktivität wurde nach der Lyse der Zellen durch Chloroform und SDS (Kapitel 3.8.3.4) mit dem Substrat PG-6 bestimmt.

Stamm	relevanter Genotyp	MalS-Aktivität (in nmol/min pro 10 ⁹ Zellen)	
		28 °C	37 °C
DHB4pCS13	Wildtyp	0,2	0,0
DHBpCS13pAB6	Wildtyp p Δ ssdegP _{S210A}	0,2	0,1
WP597pCS13	<i>trxB::kan</i>	0,2	0,0
WP597pCS13pAB6	<i>trxB::kan</i> p Δ ssdegP _{S210A}	0,1	0,1
FA112pCS13	<i>gshA::kan trxB::kan....Tn10</i>	0,2	0,0
FA112pCS13pAB6	<i>gshA::kan trxB::kan....Tn10</i> p Δ ssdegP _{S210A}	0,3	0,2
FA113pCS13	<i>gshA::kan gor522....Tn10</i>	0,4	0,1
FA113pCS13pAB6	<i>gshA::kan gor522....Tn10</i> p Δ ssdegP _{S210A}	0,1	0,1

Mit den Aktivitätsbestimmungen korrelieren die Ergebnisse des Western-Transfers. Bei Stämmen ohne *malS*-Plasmid konnte nur eine geringe Menge an oxidiertem MalS nachgewiesen werden. Dies beruht auf der schwachen chromosomalen Expression von MalS unter diesen Bedingungen. Bei einem Wachstum der Stämme bei 37 °C konnte in keinem Stammhintergrund die Bildung von Disulfidbrücken in Δ ssMalS beobachtet werden. Inkubierte man die Zellen hingegen bei 28 °C, fand bei dem Stamm mit den besten Oxidationsbedingungen im Cytoplasma (FA113) eine teilweise Ausbildung von Disulfidbrücken in Δ ssMalS statt. Die geringe Menge an oxidiertem MalS in den anderen Stammhintergründen beruhte auf der chromosomalen Expression von *malS*.

Eine Koexpression von *malS* und *degP*_{S210A} im Cytoplasma erhöhte nicht die Rate von oxidiertem MalS. Die Faltung von MalS im Cytoplasma konnte im Gegensatz zur Faltung im Periplasma (Kapitel 4.5.7) nicht durch DegP unterstützt werden.

Eine Faltung von MalS im Cytoplasma ist im Gegensatz zu alkalischer Phosphatase wesentlich schwieriger. Erst unter den am stärksten oxidierenden Bedingungen im Stamm FA113 war eine Ausbildung von Disulfidbrücken in MalS zu verzeichnen. Da der Anteil der Disulfidbrückenausbildung jedoch nicht mit der enzymatischen Aktivitätszunahme korrelierte, kommt es im Cytoplasma entweder zu falscher Verknüpfung der Disulfidbrücken, oder die enzymatische Aktivität von MalS wird im Cytoplasma durch andere Faktoren inhibiert. Die Unfähigkeit, in eine enzymatisch aktive Konformation zu falten, konnte nicht am MalS-Konstrukt liegen, da das signalsequenzlose MalS-Derivat nach der Reinigung effektiv falten konnte (Kapitel 4.6).

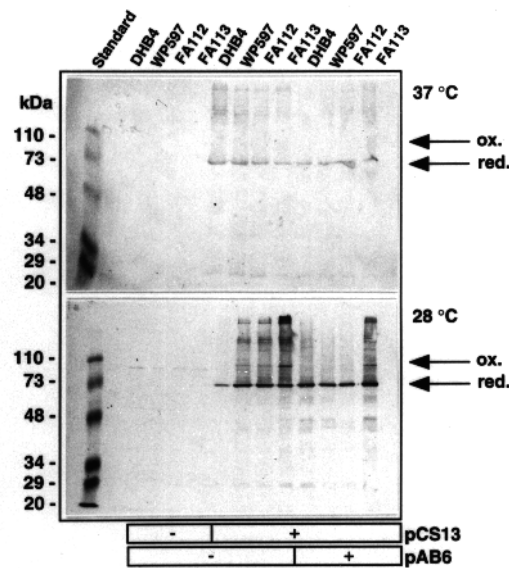


Abb. 4-13. Western-Transfer von Extrakten aus Zellen, die ein signalsequenzloses MalS-Derivat exprimieren.

Der Western-Transfer wurde mit Proben aus Ganzzellen der Stämme DHB4, WP597, FA112 und FA113 gemacht. Die Auftrennung der Proben erfolgte durch eine nicht-reduzierende 10 %-ige SDS-PAGE. Die ausgewachsenen Bakterienkulturen waren in LB-Medium mit 50 μ M IPTG bei 28 °C bzw. 37 °C gezogen worden. Die Expression von Δ ssmalS fand von dem Plasmid pCS13 und die von Δ ssdegP_{S210A} von dem Plasmid pAB6 statt. Der Nachweis von MalS erfolgte durch α -MalS-Antiserum. Die Laufhöhe von oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) MalS ist jeweils durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.6 Die Faltung von MalS *in vitro*

Nachdem die Faltung von MalS *in vivo* untersucht war, sollte durch eine Charakterisierung der *in vitro* Faltung Unterschiede und Gemeinsamkeiten ausgearbeitet werden. Außerdem ergab sich die Möglichkeit eine eventuelle direkte Interaktion von DegP bei der Faltung von MalS nachzuweisen. Für die Analyse der Faltung von MalS *in vitro* wurde ein signalsequenzloses Derivat von MalS (Δ ssMalS) gereinigt. Dieses Protein hat den Vorteil, daß aufgrund der cytoplasmatischen Lokalisierung die Cysteine im reduzierten Zustand vorliegen

und das Protein auch nicht in eine enzymatisch aktive Konformation falten kann (Kapitel 4.5.9). Weil $\Delta ssMalS$ noch nicht in seiner nativen Konformation vorlag, wird im folgenden von einer Faltung und nicht von einer Rückfaltung gesprochen. Als Indikatoren für eine Faltung von $\Delta ssMalS$ dienten die Ausbildung von Disulfidbrücken, die anhand des Laufverhaltens auf einer SDS-PAGE bestimmt worden ist, und das Erlangen der enzymatischen Aktivität, das mit dem Substrat PG-6 photometrisch quantifiziert wurde.

4.6.1 Die Reinigung von $\Delta ssMalS$ nach Expression von dem Plasmid pCS13

Die Klonierung des Plasmids pCS13 diente der erleichterten Reinigung von $\Delta ssMalS$. Von diesem Plasmid wird $\Delta ssMalS$ als N-terminales His-Tag-Protein exprimiert. Durch den His-Tag wird die Reinigung erheblich erleichtert. Das $\Delta ssMalS$ -Gen ist auf diesem Plasmid unter der Kontrolle des P_{tac} -Promotors. Nach der Induktion mit IPTG konnte das Protein drastisch überexprimiert werden, so daß es als ein unlösliches Aggregat im Cytoplasma vorlag.

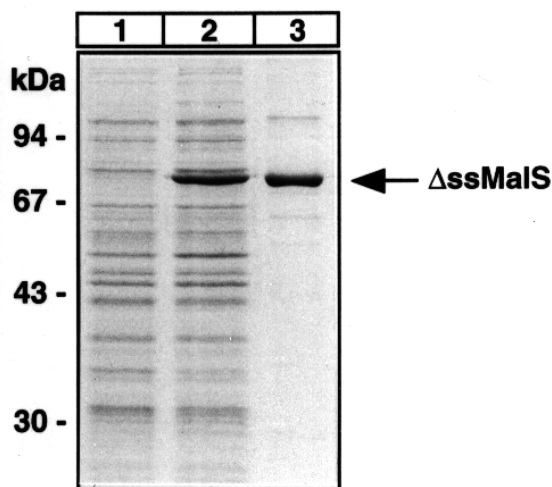


Abb. 4-14. Reinigung von $\Delta ssMalS$.

Für Abb. 4-14 wurden je 10 μ g Protein mittels einer 10 %-igen SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie angefärbt. Die Position von MalS ist durch einen Pfeil gekennzeichnet. Die Expression von $\Delta ssMalS$ erfolgte in dem Stamm DHB4 von dem Plasmid pCS13 durch die Zugabe von IPTG zu einer Konzentration von 1 mM. Die Reinigung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen (8 M Harnstoff) bei Raumtemperatur wie unter Kapitel 3.8.4.2 beschrieben.

1. Ganzzellextrakt von DHB4pCS13, uninduziert;
2. Ganzzellextrakt von DHB4pCS13, induziert mit 1 mM IPTG;
3. $\Delta ssMalS$ nach der Reinigung durch eine Ni-NTA-Säulenchromatographie.

Das Protein konnte nicht in die aktive Konformation falten, da in exprimierenden Stämmen keine erhöhte MalS-Aktivität gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt). Δ ssMalS kann auch nicht in einem Stamm mit einer *prlA4*-Mutation in das Periplasma transportiert werden. Die Translokation wird durch vier Arginine vor dem reifen Teil von MalS verhindert (Daten nicht gezeigt). Diese Arginine sind bei der Konstruktion eingeführt worden und stammen vom Vektor pQE31. N-terminal lokalisierte Aminosäuren mit positiver Ladung verhindern die Translokation signalsequenzloser periplasmatischer Proteine in *prlA4*-Mutanten (Prinz et al., 1996). Die Reinigung erfolgte deswegen unter denaturierenden Bedingungen mit 8 M Harnstoff. Da der Reinigungspuffer einen sehr sauren pH-Wert (pH 4,5) hatte, konnte es nicht zur Ausbildung von Disulfidbrücken während der Reinigung kommen. Das gereinigte Protein Δ ssMalS lag nach der Reinigung somit als komplett denaturiertes Protein ohne Disulfidbrücken vor. Die Überexpression nach der Induktion mit IPTG und die Reinheit (> 95 %) des isolierten Proteins sind in der Abbildung 4-14 dokumentiert.

4.6.2 Die Faltung von gereinigtem Δ ssMalS kann durch ein Verdünnen des Harnstoffes induziert werden

Eine Faltung von MalS konnte durch ein schlagartiges Verdünnen des Harnstoffes erzielt werden. Das Δ ssMalS bildete Disulfidbrücken aus, und eine enzymatische Aktivität war meßbar. Jedoch konnte durch diese „spontane“ Faltung das Δ ssMalS nicht vollständig in seine native Konformation überführt werden. Lediglich 20 - 25 % des Gesamtproteins bildete die Disulfidbrücken aus und war enzymatisch aktiv. Die Ausbildung der Disulfidbrücken in Δ ssMalS scheint durch den im Faltungspuffer gelösten Sauerstoff katalysiert zu werden. Die Faltung des Δ ssMalS und ihre Optimierung war von den verschiedensten Bedingungen im Faltungspuffer abhängig und ist in den folgenden Kapiteln beschrieben. Da als Kontrolle bei allen Faltungsexperimenten die „spontane“ Faltung in den Aktivitätstests und auf den Gelen dokumentiert ist, wurde sie hier nicht separat dargestellt.

4.6.3 Die Faltung von Δ ssMalS wird durch das Redoxpotential bestimmt

Bei der *in vitro* Faltung von Proteinen, die Disulfidbrücken haben, spielt das Redoxpotential eine entscheidende Rolle für die Effektivität der Disulfidbrückenausbildung und damit häufig auch für die komplette Faltung. Deshalb wurde zunächst der Einfluß verschiedener Redoxpotentiale auf die Faltung von MalS bestimmt. Die Einstellung eines bestimmten Redoxpotentials erfolgte durch eine Mischung aus reduziertem (GSH) und oxidiertem (GSSG) Glutathion. Die Bestimmung der Faltung von MalS unter den verschiedenen Redoxpotentialen geschah durch das Messen der enzymatischen Aktivität. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4-14 zusammengefaßt.

Eine Verbesserung der Faltung im Vergleich zu der „spontanen“ Faltung wurde bei fast allen getesteten Redoxpotentialen gemessen. War die Konzentration von reduziertem Glutathion höher als die von oxidiertem Glutathion, konnte eine deutlich bessere Faltung beobachtet werden als bei umgekehrten Konzentrationsverhältnissen. Beim Einsatz von GSH-Konzentrationen von mehr als 20 mM wurde eine Faltung inhibiert. Als ein optimales Redoxpotential erwiesen sich die Endkonzentration von 2,5/0,5 mM (GSH/GSSG). Für alle nun folgenden Experimente wurde deshalb bei der Zugabe von Glutathion diese Konzentration gewählt.

Tab. 4-14. MalS-Aktivität nach der Faltung bei unterschiedlichem Redoxpotential.

Die Faltung von MalS erfolgte nach dem Verdünnen von 3 µg ΔssMalS 1:25 in 100 mM Tris/HCl, pH 8,7, das mit GSH und GSSG zu den entsprechenden Endkonzentrationen versetzt war, für eine Stunde bei 28 °C. Eine MalS-Aktivität von 100 % entspricht 183 nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg ΔssMalS bei Raumtemperatur.

GSH/GSSG (in mM)	MalS-Aktivität (in %)
-/-	100
2,5/0,5	155
5,0/1,0	145
10,0/2,0	100
20,0/4,0	5
0,5/2,5	120
1,0/5,0	86

4.6.4 Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist essentiell für die Faltung von ΔssMalS in die enzymatisch aktive Konformation

Die Ausbildung von Disulfidbrücken in ΔssMalS bei der Faltung kann durch die Zugabe des Reduktans DTT verhindert werden. Durch DTT werden sich bildende und bereits ausgebildete Disulfidbrücken reduziert. Diese Experimente klären, ob bei der *in vitro* Faltung eine Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS ebenso wie bei der *in vivo* Faltung (Kapitel 4.5.1) essentiell sind oder eine Faltung auch ohne Disulfidbrücken stattfinden kann. Die Faltung erfolgte unter vier verschiedenen Bedingungen: i) „spontan“, ii) in Gegenwart des Oxidants Glutathion, iii) in Gegenwart von DTT und iv) in Gegenwart von Glutathion und einer Reduktion der Disulfidbrücken nach der Faltung durch DTT. Bei allen Ansätzen wurde die MalS-Aktivität (Tabelle 4-15) bestimmt und der Status der Disulfidbrücken auf einem SDS-Gel analysiert (Abbildung 4-15).

Tab. 4-15. MalS-Aktivität nach der Faltung in Gegenwart von DTT.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine Stunde nach dem Verdünnen von 3 µg ΔssMalS 1:25 in dem Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7) bei 28 °C. Der Faltungspuffer war bei ° mit GSH/GSSG zu 2,5/0,5 mM und bei + mit DTT zu 30 mM versetzt. Im Falle von # wurde nach der Faltung DTT zur Reduktion der Disulfidbrücken zu einer Endkonzentration von 30 mM zugesetzt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur.

Faltungsbedingung	MalS-Aktivität (in nmol/(min mg))
spontan	55
ox.°	115
ox./red.°#	87
red.+	1

Die Faltung in Gegenwart von Glutathion verbessert die Disulfidbrückenausbildung im Vergleich zur „spontanen“ Faltung. Während bei der „spontanen“ Faltung nur ca. 25 % des Proteins Disulfidbrücken ausbildete, konnte dies durch Glutathion auf über 50 % gesteigert werden. Die nach der Faltung bestimmten enzymatischen Aktivitäten entsprachen dem Grad

der Disulfidbrückenausbildung. Unter reduzierenden Bedingungen wurden keine Disulfidbrücken ausgebildet und nur 2 % der Aktivität der „spontanen“ Faltung gemessen. Fand die Reduktion der Disulfidbrücken nach der Faltung in Gegenwart von Glutathion statt, hatte dies zwar einen Einfluß auf den Status der Disulfidbrücken, nicht jedoch auf die enzymatische Aktivität. Trotz einer vollständigen Reduktion der Disulfidbrücken entsprach die gemessene Aktivität noch 75 % der des gleichen Ansatzes ohne DTT. Eine Ausbildung der Disulfidbrücken ist bei einer Faltung *in vitro* wie auch *in vivo* essentiell.

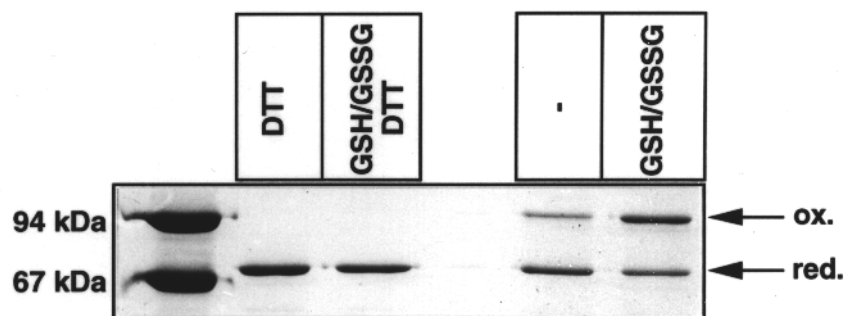


Abb. 4-15. Status der Disulfidbrücken in MalS nach der Faltung unter reduzierenden Bedingungen.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine Stunde nach dem Verdünnen von 10 µg Δ ssMalS 1:25 im Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7) bei 28 °C. Der Faltungspuffer war bei Zugabe von DTT zu 30 mM DTT und bei GSH/GSSG zu 2,5/0,5 mM GSH/GSSG versetzt worden. Bei Zugabe von GSH/GSSG DTT wurde nach der Faltung in Gegenwart von 2,5/0,5 mM GSH/GSSG das DTT zu einer Konzentration von 30 mM zur Reduktion der gebildeten Disulfidbrücken eingesetzt. Nach der Faltung wurde das Protein durch TCA gefällt und auf ein nicht-reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel geladen.

4.6.5 Die Faltung von Δ ssMalS ist abhängig von der Temperatur

Eine Temperaturabhängigkeit bei der spontanen Faltung von Proteinen *in vitro* wurde bereits für viele Proteine beobachtet. Die Faltung vieler Proteine läuft unter kühlen Temperaturen (4 °C bis 10 °C) besser ab, als bei höheren. Dadurch hat die Faltungszeit vielfach auch einen Einfluß und ist bei niedrigen Temperaturen meist verlängert. Die Faltung von Δ ssMalS in Abhängigkeit der Temperatur wurde untersucht, indem die wiedergewonnene enzymatische Aktivität (Tabelle 4-16) und die Ausbildung der Disulfidbrücken nach einer Faltung bei Temperaturen zwischen 4 °C und 37 °C analysiert wurde.

Die Faltung von Δ ssMalS war bei einer Temperatur von 4 °C sehr langsam. Nach einem Zeitraum von einer Stunde konnte unter „spontanen“ Bedingungen nur < 1 % und unter oxidierenden Bedingungen 10 % der enzymatischen Aktivität im Vergleich zur Faltung bei 28 °C gemessen werden. Verlängert man die Faltungszeit von einer auf 21 Stunden, ist bei einer Temperatur von 4 °C ein deutlicher Unterschied festzustellen. Die „spontane“ Faltung ist

50fach verbessert und bei Unterstützung durch Glutathion 11fach. Die Faltung muß bei niedriger Temperatur wesentlich langsamer ablaufen als bei Temperaturen zwischen 20 °C und 30 °C. Allerdings wurde trotz der verlängerten Faltungszeit nicht die gleiche Effizienz wie bei 21 °C oder 28 °C erreicht. Die Faltung zwischen 20 °C und 30 °C war nach einer Stunde fast vollständig abgelaufen. Eine Verlängerung der Faltungszeit hatte nur einen geringen Einfluß. Fand die Faltung bei einer Temperatur von 37 °C statt, war nach einem Zeitraum von einer Stunde nur 2 % und nach 21 Stunden 14 % der Aktivität im Vergleich zur Faltung bei 21 °C meßbar. Eine „spontane“ Faltung bei 37 °C war deutlich geringer und ineffizienter als bei niedriger Temperatur (4 °C). Eine Faltung bei 37 °C in Gegenwart von Glutathion verbesserte zwar die Ausbildung der Disulfidbrücken, jedoch wurde nur eine geringe enzymatische Aktivität von 7 % im Vergleich zur Faltung bei 21 °C oder 28 °C gemessen. Durch eine auf 21 Stunden verlängerte Faltungsdauer konnte die Faltungseffizienz gesteigert werden.

Tab. 4-16. Aktivität von Δ ssMalS nach Faltung bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiträumen.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine bzw. 21 Stunden nach dem Verdünnen von 0,8 μ g Δ ssMalS 1:25 in dem temperierten Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7). Der Faltungspuffer war bei # mit Glutathion zu 2,5/0,5 mM GSH/GSSG versetzt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg Δ ssMalS angegeben.

Faltungsbedingung	Faltungstemperatur (in °C)			
	4	21	28	37
spontan; 1 h	1	125	114	3
GSH/GSSG#; 1 h	11	183	185	13
spontan; 21 h	47	143	119	20
GSH/GSSG#; 21 h	123	185	203	85

Die gemessenen Aktivitäten korrelieren mit der Ausbildung der Disulfidbrücken in Δ ssMalS (Abbildung 4-16). Bei einer Faltungsdauer von einer Stunde war unter „spontanen“ Bedingungen bei einer Temperatur von 4 °C keine und bei 37 °C nur eine geringe Ausbildung zu beobachten. Die Ausbildung der Disulfidbrücken bei 21 °C und 28 °C war gleich gut. Die Zugabe von Glutathion erhöhte bei allen Faltungstemperaturen die Effizienz der Ausbildung der Disulfidbrücken.

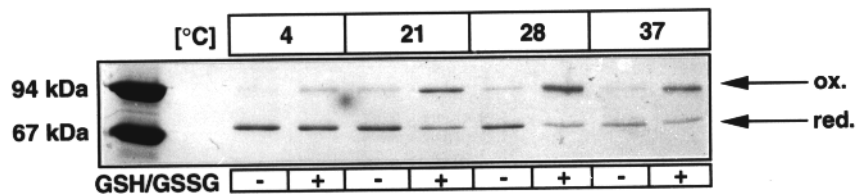


Abb. 4-16. Faltung von Δ ssMalS bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine Stunde nach dem Verdünnen von 3 μ g Δ ssMalS 1:25 in dem Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7), der auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt war. Bei der Zugabe von Glutathion war der Faltungspuffer mit GSH/GSSG-Konzentrationen von 2,5/0,5 mM versetzt. Die Proben wurden nach der Faltung mit TCA gefällt und mittels eines nicht-reduzierenden 10 %-igen SDS-Gels aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt. Die Laufhöhe von oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) MalS ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.6.6 Der Einfluß von DsbA auf die Faltung von Δ ssMalS *in vitro* ist gering

Die Ausbildung von Disulfidbrücken wird *in vivo* durch die Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA katalysiert (Bardwell et al., 1991), und auch die effiziente Disulfidbrückenausbildung in MalS ist von DsbA abhängig (Kapitel 4.5.1). Auch *in vitro* kann die Ausbildung von Disulfidbrücken in Proteinen durch DsbA katalysiert werden (Frech und Schmid, 1995). DsbA ist besonders dann geeignet, wenn die Disulfidbrückenausbildung geschwindigkeitsbestimmend für die Faltung *in vitro* ist. Da die korrekte Faltung oft mit einer unspezifischen Aggregation während des Faltungsvorganges konkurriert (Zettlmeissl et al., 1979), können bei Verwendung von DsbA nicht nur kürzere Zeiten für die Rückfaltung, sondern auch größere Ausbeuten an nativem Protein erwartet werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde nur der Effekt von DsbA auf die Ausbeute der Faltung von Δ ssMalS untersucht.

Durch eine Zugabe von DsbA konnte die Faltung nur geringfügig gesteigert werden. Die Bestimmung der MalS-Aktivität (Tabelle 4-17) zeigte, daß bei dem Einsatz von 0,02 μ M bzw. 0,2 μ M DsbA bei der Faltung die Aktivität um 10 bzw. 17 % anstieg. Erst bei DsbA-Konzentrationen von 2 μ M konnte eine Steigerung um 50 % festgestellt werden. Bei dieser hohen DsbA-Konzentration ist allerdings nicht mehr von einer katalytischen Ausbildung der Disulfidbrücken auszugehen. Das als Kontrolle eingesetzte BSA hatte keinerlei Einfluß auf die Faltung von Δ ssMalS.

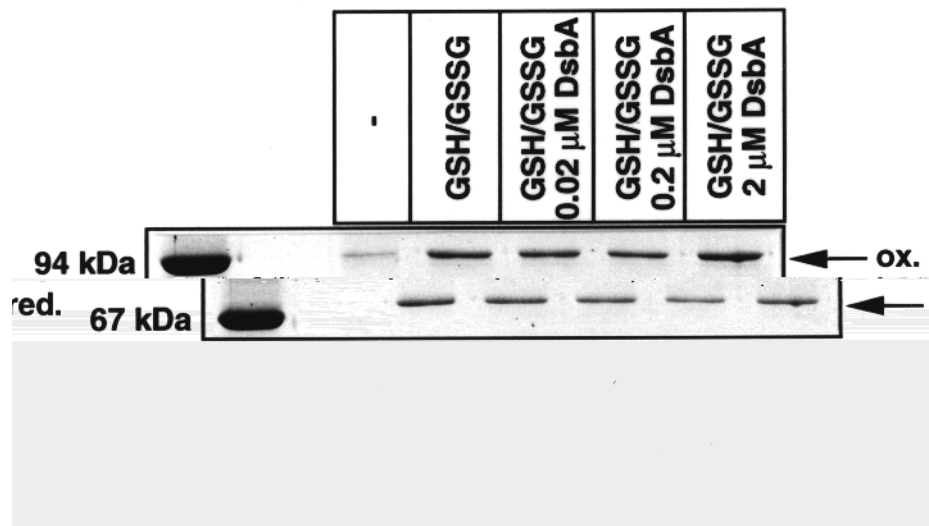
Auch bei einer Faltungstemperatur von 37 °C (Daten nicht gezeigt), konnte kein stärkerer Effekt von DsbA bestimmt werden.

Tab. 4-17. MalS-Aktivität nach Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart von unterschiedlichen DsbA-Konzentrationen.

Nach dem Verdünnen von 0,8 μ g Δ ssMalS 1:25 in 100 mM Tris/HCl, pH 8,7 fand die Faltung für eine Stunde bei 28 °C statt. Der Faltungspuffer war im Falle von Glutathion zu 2,5/0,5 mM GSH/GSSG und beim Einsatz von DsbA und BSA zu den angegebenen Endkonzentrationen versetzt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte als unabhängige Doppelbestimmung (Abweichung max. 5 %) mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg Δ ssMalS angegeben.

Faltungsbedingung	MalS-Aktivität (in nmol/(min mg))
spontan	79
GSH/GSSG	125
GSH/GSSG + 0,02 μ M DsbA	137
GSH/GSSG + 0,20 μ M DsbA	146
GSH/GSSG + 2,00 μ M DsbA	187
GSH/GSSG + 1,00 μ g BSA	120
GSH/GSSG + 10,00 μ g BSA	122

Mit den bestimmten MalS-Aktivitäten korrelierte der Grad der Disulfidbrückenbildung (Abbildung 4-17). Bei Inkubation mit Glutathion war die Effizienz im Vergleich zur „spontanen“ Faltung gesteigert, konnte aber durch eine Zugabe von DsbA nicht wesentlich erhöht werden.

**Abb. 4-17. Disulfidbrückenausbildung in Gegenwart unterschiedlicher DsbA-Konzentrationen.**

Die Faltung von MalS erfolgte bei 28 °C für eine Stunde nach dem Verdünnen von 3 μ g Δ ssMalS 1:25 in dem Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7). Dem Faltungspuffer war Glutathion zu einer Konzentration von 2,5/0,5 mM (GSH/GSSG) und DsbA, wie angegeben, beigefügt. Die Proben wurden nach der Faltung mit TCA gefällt und mittels eines nicht-reduzierenden 10 %-igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Laufhöhe von oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) MalS ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.6.7 Δ ssMalS kann nur bei alkalischem pH-Wert falten

Nur bei einem pH-Wert $> 8,0$ können sich Disulfidbrücken effektiv spontan durch die Anwesenheit von Sauerstoff bilden. Bei einem niedrigerem pH-Wert muß eine Disulfidbrückenbildung durch oxidierende Substanzen oder Proteine katalysiert werden. Die Bildung von Disulfidbrücken kann durch Glutathion ab einem pH-Wert von pH 6,0 katalysiert werden (Ruddock et al., 1996). DsbA hat die Eigenschaft bereits ab pH 4,0 als Disulfid-Oxidoreduktase zu wirken (Wunderlich et al., 1993). Die Abhängigkeit der Faltung von Δ ssMalS vom pH-Wert (pH 6,0 bis pH 8,7) wurde durch die Analyse der Disulfidbrückenbildung mittels eines SDS-Gels (Abbildung 4-18) und der Bestimmung der gewonnenen enzymatischen Aktivität (Tabelle 4-18) untersucht.

Tab. 4-18. MalS-Aktivitäten nach der Faltung von Δ ssMalS bei unterschiedlichen pH-Werten.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine Stunde nach dem Verdünnen von 3 μ g Δ ssMalS 1:25 in dem vorgewärmten Faltungspuffer (100 mM BisTris/HCl, pH 6,0 und 100 mM Tris/HCl bei pH 6,8 bis pH 8,7). Der Faltungspuffer war bei # mit GSH/GSSG zu 2,5/0,5 mM und bei ° mit DsbA zu 0,2 μ M versetzt. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg Δ ssMalS angegeben. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch zwei voneinander unabhängige Messungen, die max. 10 % voneinander abwichen.

Faltungsbedingung	pH-Wert der Faltung				
	6,0	6,8	7,5	8,0	8,7
spontan	4	5	32	43	88
GSH/GSSG#	4	2	34	86	133
GSH/GSSG# DsbA°	2	4	41	97	144

Bei einem pH-Wert von pH 6,0 oder 6,8 fand nahezu keine Disulfidbrückenbildung statt, und eine enzymatische Aktivität konnte nicht nachgewiesen werden. Bei pH 7,5 bildeten sich Disulfidbrücken aus, jedoch konnte die Ausbildung nicht durch Glutathion oder DsbA katalysiert werden. Die Faltung war ineffektiv, da nur ein geringer Anteil des Proteins Disulfidbrücken ausbildete und lediglich 36 % der Aktivität im Vergleich zu der Faltung bei pH 8,7 nachgewiesen werden konnten. Bei pH 8,0 und 8,7 war die Faltung von Δ ssMalS wesentlich effektiver, und die Bildung der Disulfidbrücken konnte durch Glutathion und DsbA katalysiert werden. Die Ausbeute der Faltung bei zusätzlicher Katalyse durch DsbA konnte nur um 13 bzw. 8 % (bei pH 8,0 bzw. 8,7) im Vergleich zur alleinigen Katalyse durch Glutathion gesteigert werden.

Das Protein Δ ssMalS kann somit bei einem sauren pH-Wert nicht falten. Bis zu einem pH-Wert von pH 8,0 konnte durch Glutathion oder DsbA eine Disulfidbrückenbildung in MalS nicht katalysiert werden. Ab diesem pH-Wert war eine Katalyse möglich, wobei der Beitrag des DsbA gering war.

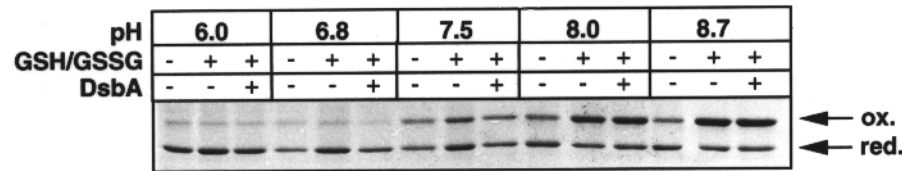


Abb. 4-18. Disulfidbrückenausbildung in Δ ssMalS bei unterschiedlichen pH-Werten.

Die Faltung von MalS erfolgte für eine Stunde nach dem Verdünnen von 3 μ g Δ ssMalS 1:25 in dem Faltungspuffer. Als Puffer wurde bei pH 6,0 BisTris/HCl und bei allen anderen pH-Werten Tris/HCl in einer Endkonzentration von 100 mM gewählt. Wenn durch (+) bezeichnet, war dem Faltungspuffer Glutathion zu einer Konzentration von 2,5/0,5 mM (GSH/GSSG) und DsbA zu 0,2 μ M beigefügt. Die Proben wurden nach der Faltung mit TCA gefällt und mittels eines nicht-reduzierenden 10 %-igen SDS-Gels aufgetrennt. Die Laufhöhe von oxidiertem (ox.) und reduziertem (red.) MalS ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

4.6.8 PG-6 inhibiert die Faltung von Δ ssMalS

Die Faltung von Proteinen *in vivo* findet meist in Gegenwart ihrer Substrate statt und auch *in vitro* kann in manchen Fällen durch die Substrate die Effektivität der Faltung gesteigert werden (Buchner et al., 1998). Um einen Effekt des Substrats PG-6 auf die Faltung von Δ ssMalS zu studieren, wurde die Faltung von Δ ssMalS (81 nM) in Gegenwart von PG-6 (2 mM) durchgeführt. Die Faltung fand für eine Stunde bei 25 °C statt. Nach diesem Zeitraum konnte keinerlei enzymatische Aktivität bestimmt werden. Auch nach einer verlängerten Inkubation bei dieser Temperatur oder einer erneuten Zugabe von Substrat war keine MalS-Aktivität nachweisbar. Weder die Anwesenheit von Glutathion (2,5/0,5 mM GSH/GSSG) noch DsbA (2 μ M) im Ansatz konnte eine Faltung von MalS in Gegenwart des Substrats unterstützen. Das Substrat PG-6 ist somit zugleich ein Faltungsinhibitor von MalS. Dies gewährleistete, daß nach dem Starten der enzymatischen Reaktion die Faltung gestoppt und exakt dieser Status durch eine Bestimmung der enzymatischen Aktivität analysiert werden konnte. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Δ ssMalS nach der Faltung fand häufig bei anderen Temperaturen oder pH-Werten als die vorangegangene Faltung statt, was jedoch aufgrund der Inhibition durch PG-6 keinerlei Einfluß auf den Faltungsstatus hatte.

4.6.9 Die Faltung von MalS *in vitro* in Gegenwart von DegP und DegP_{S210A}

4.6.9.1 Reinigung von DegP und DegP_{S210A}

Bei einer „spontanen“ Faltung *in vitro* ist der Sauerstoff das einzige Oxidationsmittel für die Disulfidbrückenbildung. Bei der Faltung von MalS *in vivo* ist die Disulfidbrückenbildung

hingegen in einem *dsbA*-Stamm nicht nur abhängig vom Sauerstoff, sondern auch noch von der Protease DegP. Um einen Effekt von DegP auf die Faltung von MalS *in vitro* zu untersuchen, wurden die Proteine DegP und DegP_{S210A} gereinigt. Da die Reinigung über klassische Methoden aufwendig und mit einer geringen Ausbeute verbunden ist (Cavard et al., 1989), wurden die Plasmide pCS20 und pCS21 konstruiert. Auf diesen Plasmiden ist *degP* bzw. *degP*_{S210A} unter Kontrolle des durch IPTG induzierbaren Promotors P_{tac}. Dies ermöglicht eine effiziente Überproduktion. Als Ausgangsvektor für die Klonierung der Plasmide pCS20 und pCS21 diente pCS19. Die Gene *degP* und *degP*_{S210A} wurden so in pCS19 inkloniert, daß sich vor dem Stopcodon die Sequenz (CAT CAC)₃ befindet, wodurch die Genexpression als C-terminale His-Tag-Proteine erfolgt. Die Reinigung der Proteine konnte deshalb nach der Lyse der Zellen durch nur einen Schritt, einer Ni-NTA-Säule, erfolgen. Die Induktion durch IPTG und die Reinheit des gereinigten Proteins ist für die Proteine DegP und DegP_{S210A} auf der Abbildung 4-19 bzw. 4-20 dargestellt. Die Proteine laufen auf einer SDS-PAGE bei ihrem theoretischen Molekulargewicht von 48 kDa. DegP ist *in vivo* autoproteolytisch aktiv (Lipinska et al., 1990). Die zwei Hauptspaltstellen sind nach Cystein-69 und Glutamin-82 des reifen Proteins (Skórko-Glonek et al., 1995b). Die Produkte der Proteolyse haben eine molekulare Masse von 41 bzw. 40 kDa. Da bei DegP_{S210A} keine Spaltprodukte identifiziert wurden, ist dies bereits ein erster Hinweis, daß das Protein nicht proteolytisch aktiv ist.

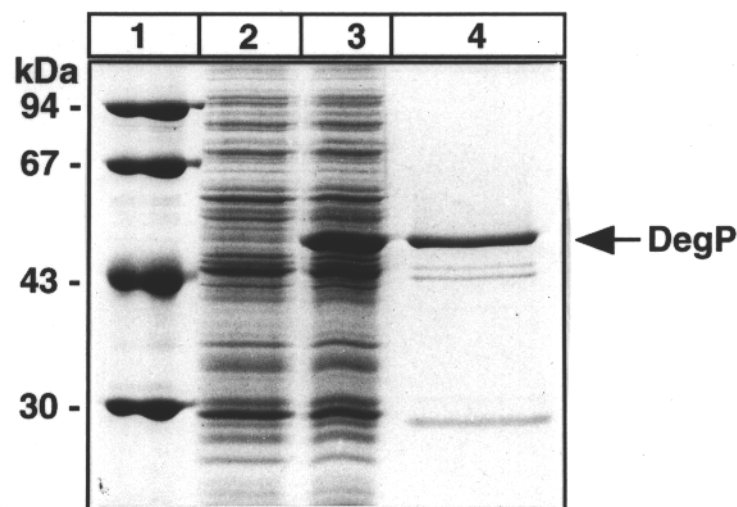


Abb. 4-19. Überproduktion und Reinigung von DegP.

Für die Reinigung von DegP wurde der Stamm CLC198pCS20 bei 28 °C gezogen. Die Expression von *degP* erfolgte nach der Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 10 μM über Nacht. Die Lyse der Zellen erfolgte durch die French Press und die daran anschließende Reinigung von DegP durch eine Ni-NTA-Säule. Die Auftrennung von jeweils 15 μg Protein erfolgte durch ein 10 %-iges SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen und anschließende Anfärbung durch Coomassie.

Molekulargewichtsstandard; 1. Ganzzellextrakt von CLC198pCS20, uninduziert; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pCS20, induziert mit 10 μM IPTG; 3. DegP nach der Ni-NTA-Säule.

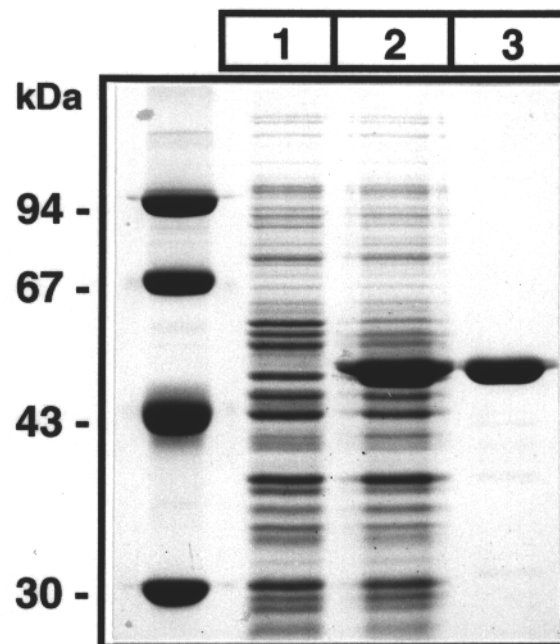


Abb. 4-20. Überproduktion und Reinigung von DegP_{S210A}.

Für die Reinigung von DegP_{S210A} wurde der Stamm CLC198pCS21 bei 28 °C gezogen. Die Expression von *degP*_{S210A} erfolgte nach der Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 10 μM über Nacht. Die Zellen sind durch die French Press aufgeschlossen und das Protein DegP_{S210A} über eine daran anschließende Ni-NTA-Säule gereinigt worden. Die Auftrennung von jeweils 15 μg Protein erfolgte durch ein 10 %-iges SDS-Gel unter reduzierenden Bedingungen und anschließende Anfärbung durch Coomassie.

Molekulargewichtsstandard; 1. Ganzzellextrakt von CLC198pCS21, uninduziert; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pCS21, induziert mit 10 μM IPTG; 3. DegP_{S210A} nach der Ni-NTA-Säule.

4.6.9.2 DegP_{S210A} ist proteolytisch inaktiv

Die proteolytische Aktivität von Proteasen kann durch Resorufin-markiertes Casein als universelles Substrat quantifiziert werden. Um nachzuweisen, ob das DegP_{S210A} eine proteolytische Aktivität besitzt, wurde die Aktivität mit diesem Substrat bestimmt. Es konnte im Gegensatz zu DegP keine Aktivität nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Weitere Nachweise zur proteolytischen Inaktivität ergeben sich aus der Unfähigkeit, reduziertes oder ungefaltetes MalS abzubauen (Kapitel 4.9.1.1).

4.6.9.3 DegP_{S210A} hat keinen Einfluß auf die enzymatische Aktivität von MalS

Bevor ein Einfluß von DegP_{S210A} und des als Kontrolle verwendeten BSA auf die Faltung von ΔssMalS studiert werden konnte, mußte geprüft werden, ob diese Proteine die enzymatische Aktivität von bereits gefaltetem MalS beeinflussen. Hierfür wurde natives MalS mit DegP_{S210A} bzw. BSA inkubiert und anschließend die enzymatische Aktivität bestimmt (Tabelle 4-19).

Tab. 4-19. Einfluß von DegP_{S210A} und BSA auf die MaIS-Aktivität.

Δ ssMaIS (30 μ g/ml) wurde in einem Puffer von 50 mM Tris/HCl, pH 8,7 für fünf Minuten mit DegP_{S210A} bzw. BSA (Endkonzentration je 15 μ g/ml) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte bei Raumtemperatur mit dem Substrat PG-6. Eine Aktivität von 100 % entspricht 600 nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg MaIS. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch eine Doppelbestimmung, deren Werte max. 5 % voneinander abwichen.

	MaIS-Aktivität (in %)
-	100
DegP _{S210A}	98
BSA	92

Weder in Gegenwart von DegP_{S210A} noch in Gegenwart von BSA konnte ein signifikanter Einfluß auf die MaIS-Aktivität beobachtet werden. Ein Anstieg der enzymatischen Aktivität nach der Faltung von Δ ssMaIS in Gegenwart der beiden Proteine kann somit nicht auf einer Steigerung der Aktivität des nativen Proteins beruhen.

4.6.9.4 DegP ist bei der Harnstoffkonzentration im MaIS-Faltungspuffer noch proteolytisch aktiv

Δ ssMaIS liegt nach der Reinigung in 8 M Harnstoff vor. Eine Faltung wird durch das Verdünnen des Harnstoffs auf 0,32 M initiiert. DegP kann eine Faltung von Δ ssMaIS nur unterstützen, wenn seine Stabilität nicht durch diese Harnstoffkonzentration beeinträchtigt wird. Als Kriterium für die Stabilität diente die proteolytische Aktivität, die bei verschiedenen Harnstoffkonzentrationen mit Resorufin-markiertem Casein bestimmt wurde (Tabelle 4-20). Es sind Harnstoffkonzentrationen von 0 mM bis 2,5 mM getestet worden.

Tab. 4-20. Bestimmung der DegP-Aktivität bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen.

Die proteolytische Aktivität von DegP wurde mit dem Substrat Resorufin-markiertes Casein bei 37 °C bestimmt. Eine Aktivität von 100 % entspricht 0,2 nmol pro Minute und mg gespaltenes Substrat. Dem Reaktionspuffer (Endkonzentration 90 mM Tris/HCl, pH 7,5) war 5 μ g DegP und der Harnstoff zu der angegebenen Konzentration zugefügt.

Harnstoffkonzentration (in M)	DegP-Aktivität (in %)
0,00	100
0,10	101
0,32	88
0,50	51
0,75	33
1,00	21
1,28	15
2,50	3

Bei Harnstoffkonzentrationen bis 300 mM war nur ein schwacher Abfall (12 %) der DegP-Aktivität bemerkbar. Ein deutlicher Verlust der proteolytischen Aktivität trat erst bei Konzentrationen > 500 mM auf, und ab einer Konzentration von 2,5 M war keine Aktivität mehr bestimmbar. DegP ist somit unter den Bedingungen der Δ ssMaIS-Faltung aktiv und stabil.

4.6.9.5 DegP und DegP_{S210A} unterstützen die Ausbildung der Disulfidbrücken bei der Faltung von Δ ssMalS

Um den Einfluß von DegP auf die Faltung von Δ ssMalS zu bestimmen, wurde die Disulfidbrückenausbildung von Δ ssMalS in Anwesenheit von DegP und DegP_{S210A} analysiert. Das Protein war nach der Faltung ausgefällt, über eine SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt worden (Abbildung 4-21).

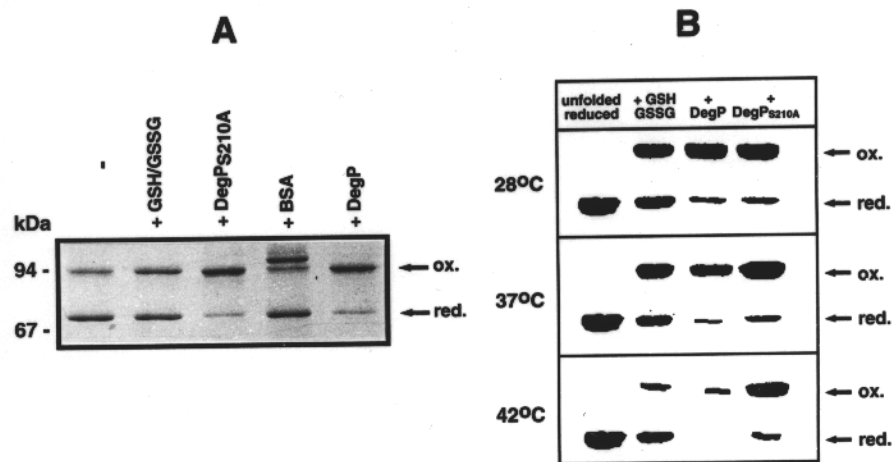


Abb. 4-21. Disulfidbrückenausbildung bei der Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart von DegP und DegP_{S210A}.

(A) Die Faltung von 5 μ g Δ ssMalS war durch eine 1:25 Verdünnung im Faltungspuffer (100 mM Tris/HCl, pH 8,7), der auf 28 °C vorgewärmt war, gestartet worden.

(B) 15 μ g Δ ssMalS wurden in auf die entsprechende Temperatur vorgewärmten Faltungspuffer 1:25 verdünnt. (A) + (B) Der Faltungspuffer war, wenn aufgeführt, mit Glutathion oder äquimolaren Konzentrationen an DegP, DegP_{S210A} oder BSA supplementiert. Nach einstündiger Faltung wurde das Protein mit TCA gefällt, mittels nicht-reduzierender 10 %-iger SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt.

Die Abbildung 4-21 (A) zeigt die Disulfidbrückenausbildung nach einer Faltung bei 28 °C unter verschiedenen Bedingungen. Bei einer „spontanen“ Faltung bilden ca. 20 % des Proteins die Disulfidbrücken aus. In Gegenwart von Glutathion ist der Anteil von oxidiertem MalS auf ca. 50 % erhöht. Bei der Faltung in Anwesenheit von DegP und DegP_{S210A} war eine weitere Steigerung des Anteils an oxidiertem MalS nachweisbar. Bei einer Temperatur von 28 °C unterstützen sowohl DegP_{S210A} als auch DegP die Ausbildung von Disulfidbrücken von Δ ssMalS bei der Faltung. Als Kontrolle dienten die Proteine BSA und Lysozym (die Kontrolle mit Lysozym ist nicht gezeigt). Beide Proteine konnten nicht die Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS unterstützen. Der Anteil an oxidiertem MalS entspricht dem bei der „spontanen“ Faltung. Bei der zusätzlichen Proteinbande, die etwas höhermolekulare als oxidiertes MalS läuft, handelt es sich nicht um eine Form von MalS, sondern um das BSA-Dimer, das in der BSA-Fraktion vorlag.

In der Abbildung 4-21 (B) ist die Faltung bei unterschiedlichen Temperaturen dargestellt. DegP_{S210A} konnte nicht nur bei 28 °C die Ausbildung von Disulfidbrücken unterstützen, sondern auch bei 37 °C und 42 °C. Der Anteil von MalS mit Disulfidbrücken war insbesondere bei 42 °C drastisch im Vergleich zur Faltung in Anwesenheit von Glutathion erhöht. In Gegenwart von DegP wurde mit der Temperaturerhöhung zunehmend reduziertes MalS abgebaut. Ebenso scheint die komplette Proteinmenge reduziert zu sein. Mit steigender Temperatur fand ein schneller Abbau von reduziertem MalS statt und nur der Anteil, der „spontan“ faltete, konnte dem Abbau entgehen. Die Möglichkeit, daß DegP zunächst Δ ssMalS faltet und dann abbaut, kann ausgeschlossen werden, da korrekt gefaltetes MalS kein Substrat für DegP darstellt (Kapitel 4.9.1.2).

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß DegP bei niedriger Temperatur Chaperonaktivität hat, die bei erhöhter Temperatur von der Proteaseaktivität überlagert wird.

4.6.9.6 Die Faltung von Δ ssMalS in der Anwesenheit von DegP_{S210A} erhöht die Ausbeute an aktivem MalS

Um die Chaperonaktivität von DegP näher zu charakterisieren, wurde der Effekt von unterschiedlichen DegP_{S210A}-Konzentrationen auf die Faltung von Δ ssMalS untersucht. Die Faltung von Δ ssMalS ist bei 28 °C, 37 °C und 42 °C durchgeführt worden. Die Zugabe von DegP_{S210A} erfolgte bis zu einem 40fachen molaren Überschuß (Dodecamer DegP_{S210A} zu Monomer MalS). Die wiedererlangte enzymatische Aktivität von MalS unter den verschiedenen Bedingungen ist in der Abbildung 4-22 graphisch dargestellt.

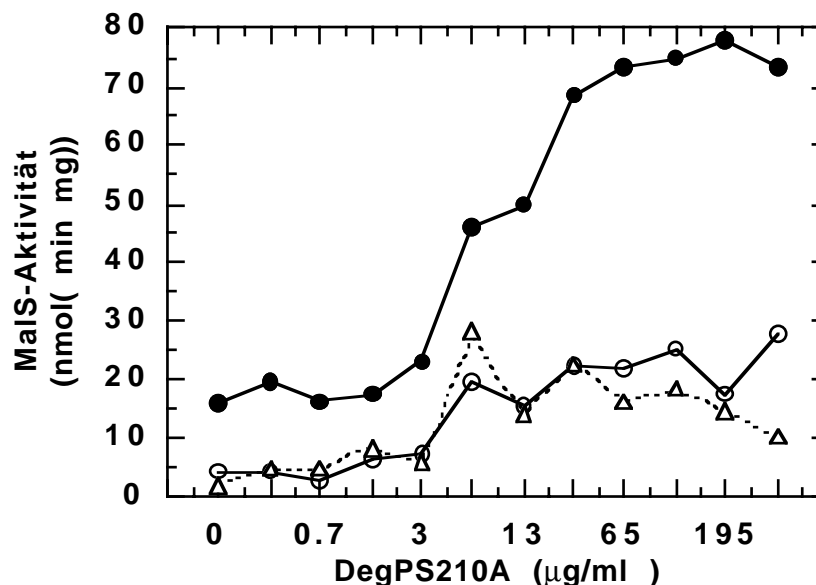


Abb. 4-22. Faltung von Δ ssMalS in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von DegP_{S210A}.

Die Faltung von Δ ssMalS (27 µg/ml) wurde durch ein Verdünnen des Proteins 1:25 in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, das auf 28 °C (●), 37 °C (○) oder 42 °C (△) vorgewärmt war und DegP_{S210A} in der angegebenen Konzentration enthielt, erzielt. Die Faltung fand für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur statt. Anschließend wurde die MalS-Aktivität mit dem Substrat PG-6 bei Raumtemperatur bestimmt und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg Δ ssMalS angegeben.

Bis zu einer DegP_{S210A}-Konzentration von 6 µg/ml (äquimolar) wurde die Faltung von ΔssMalS nicht beeinflusst. Oberhalb dieser Konzentration stimulierte DegP_{S210A} die Faltung von DegP. Bei einer Temperatur von 28 °C konnte die Faltung auf das maximal 5fache der spontanen Faltung gesteigert werden. Eine Faltung von ΔssMalS bei einer Temperatur von 37 °C und 42 °C ist zwar weniger produktiv als bei 28 °C, aber die Stimulation durch DegP_{S210A} ist stärker. Die Ausbeute an aktivem MalS konnte durch DegP_{S210A} bei 37 °C auf das maximal 7fache und bei 42 °C um das 10fache gesteigert werden.

Als Kontrolle, um einen unspezifischen Effekt auszuschließen, wurde das Titrationsexperiment mit dem Protein Lysozym durchgeführt. Das Lysozym konnte die Faltung von ΔssMalS nicht wesentlich steigern. Die Ergebnisse sind in Kapitel 4.8.1.5 aufgeführt.

4.6.9.7 Eine Faltung von MalS ohne die Ausbildung der Disulfidbrücken ist auch in Gegenwart von DegP_{S210A} nicht möglich

Für die spontane Faltung von ΔssMalS *in vitro* ist die Ausbildung der Disulfidbrücken unerlässlich (Kapitel 4.6.4). Kann DegP_{S210A} eine Faltung von ΔssMalS ohne Knüpfung der Disulfidbrücken vermitteln? Um diese Frage zu klären, wurde die Faltung von ΔssMalS unter reduzierenden Bedingungen in der Anwesenheit von DegP_{S210A} durchgeführt und anschließend die MalS-Aktivität bestimmt (Tabelle 4-21).

Tab. 4-21. Faltung von ΔssMalS in Gegenwart von DegP_{S210A} unter reduzierenden Bedingungen.

Zur Faltung von ΔssMalS (30 µg/ml) wurde das Protein 1:25 in einem Puffer von 50 mM Tris/HCl, pH 8,7 verdünnt und für eine Stunde bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Unter den reduzierenden Bedingungen war dem Puffer DTT zu 20 mM zugesetzt. Im Ansatz mit DegP_{S210A} war dieses zu einer Konzentration von 0,25 µM zugefügt worden. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte bei Raumtemperatur mit dem Substrat PG-6 und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg ΔssMalS angegeben. Die Aktivitätsbestimmung erfolgte durch eine unabhängige Doppelbestimmung, deren Resultate max. 5 % voneinander abwichen.

Faltungsbedingung	Faltungstemperatur (in °C)	
	28	37
spontan	43	7
+ DTT	2	< 1
+DTT + DegP _{S210A}	1	< 1

Die enzymatischen Aktivitäten nach einer Faltung unter reduzierenden Bedingungen in Abwesenheit und Anwesenheit von DegP_{S210A} unterschieden sich nicht signifikant. Durch DegP_{S210A} kann somit eine Faltung nicht stimuliert werden. Eine Faltung von ΔssMalS ohne eine Ausbildung der Disulfidbrücken ist auch mit Unterstützung von DegP_{S210A} nicht möglich.

4.7 DegP ist ein allgemeines Chaperon

Um zu untersuchen, ob DegP nur die Faltung von MalS stimulieren kann oder ein allgemeines Chaperon ist, wurde der Effekt auf die Rückfaltung weiterer Proteine untersucht. Diese Proteine wurden so gewählt, daß sie keine natürlichen Substrate für DegP sein können, weil sie in einem anderen Kompartiment als DegP lokalisiert sind.

4.7.1 DegP und DegP_{S210A} unterstützen die Rückfaltung von chemisch denaturierter Citrat Synthase

Die Citrat Synthase ist ein häufig für Rückfaltungsstudien verwendetes Enzym. Die Denaturierung des Enzyms erfolgte chemisch durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid zu einer Endkonzentration von 6 M. Eine Rückfaltung der Citrat Synthase wird durch das Verdünnen des Guanidiniumhydrochlorids initiiert und kann über die wiedergewonnene enzymatische Aktivität nachgewiesen werden. Diese wurde in Abhängigkeit der Rückfaltungszeit bestimmt. Das Ergebnis ist in der Abbildung 4-23 gezeigt.

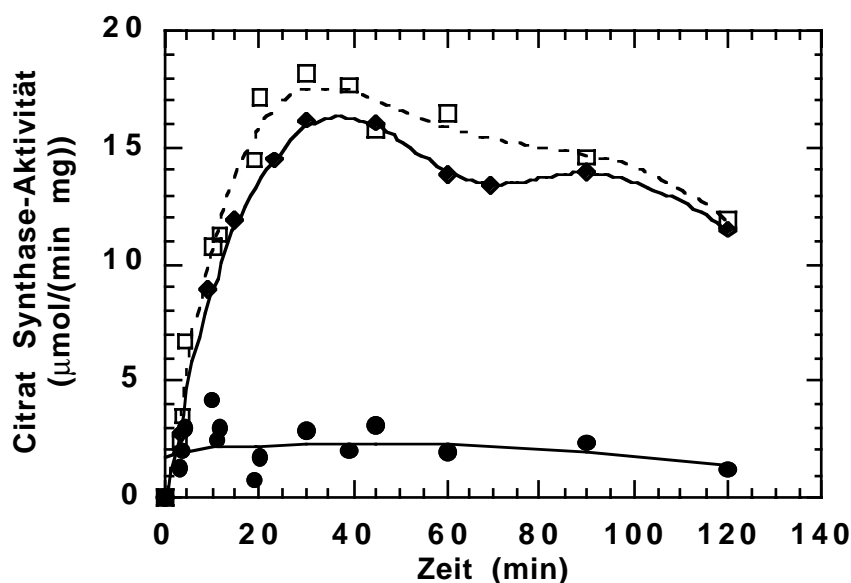


Abb. 4-23. Reaktivierung von chemisch denaturierter Citrat Synthase in Gegenwart von DegP und DegP_{S210A}.

Die Citrat Synthase (0,15 µM) wurde durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid zu einer Endkonzentration von 6 M und einer anschließenden Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur denaturiert. Die Rückfaltung erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0 bei 28 °C spontan (●) oder in Anwesenheit von äquimolaren Konzentrationen an DegP (◆) oder DegP_{S210A} (□). Nach unterschiedlichen Zeitpunkten wurde ein Aliquot entnommen und die enzymatische Aktivität bestimmt. Die Aktivität der Citrat Synthase ist in µmol gebildetes Coenzym A pro mg Protein und Minute bei 28 °C angegeben. Die enzymatische Aktivität von nicht denaturierter Citrat Synthase betrug 99 µmol pro Minute und mg Protein.

In der Abwesenheit von molekularen Chaperonen faltet die Citrat Synthase nicht zurück. Nur 3 % der Ausgangsaktivität konnten nachgewiesen werden. Die Rückfaltung in der Anwesenheit von DegP oder DegP_{S210A} ist wesentlich effektiver. Beide Proteine wurden in äqui-

molarem Verhältnis (Dodecamer DegP/DegP_{S210A} zum Dimer Citrat Synthase) zugegeben. 16 % (DegP) bzw. 18 % (DegP_{S210A}) der Citrat Synthase falteten korrekt zurück und waren enzymatisch aktiv. Die Rückfaltung von chemisch denaturierter Citrat Synthase konnte somit durch DegP und DegP_{S210A} unterstützt werden. Als Kontrolle wurde der Effekt des Proteins Lysozym auf die Rückfaltungseffizienz bestimmt. In Anwesenheit von Lysozym war keine Steigerung der spontanen Rückfaltung meßbar. Da die Rückfaltung bei einer Temperatur von 28 °C durchgeführt wurde, ist die proteolytische Aktivität von DegP gering (Kapitel 4.9.4.1) und hatte keinen Einfluß.

Die Citrat Synthase ist ein weiteres Substrat für das Chaperon DegP.

4.7.2 DegP_{S210A} kann denaturierte und aggregierte β -Galaktosidase renaturieren

Die β -Galaktosidase wurde durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid zu einer Endkonzentration von 6 M denaturiert. Die Denaturierung der β -Galaktosidase durch Guanidiniumhydrochlorid führt zu einer Aggregation des ungefalteten Proteins (Nichtl et al., 1998). Zur Faltung müssen sich somit zuerst die Aggregate auflösen. Die Rückfaltung der β -Galaktosidase wurde durch ein Verdünnen des entfaltenen Proteins bei unterschiedlichen Temperaturen initiiert und anschließend die wiedergewonnene enzymatische Aktivität gemessen (Abbildung 4-24).

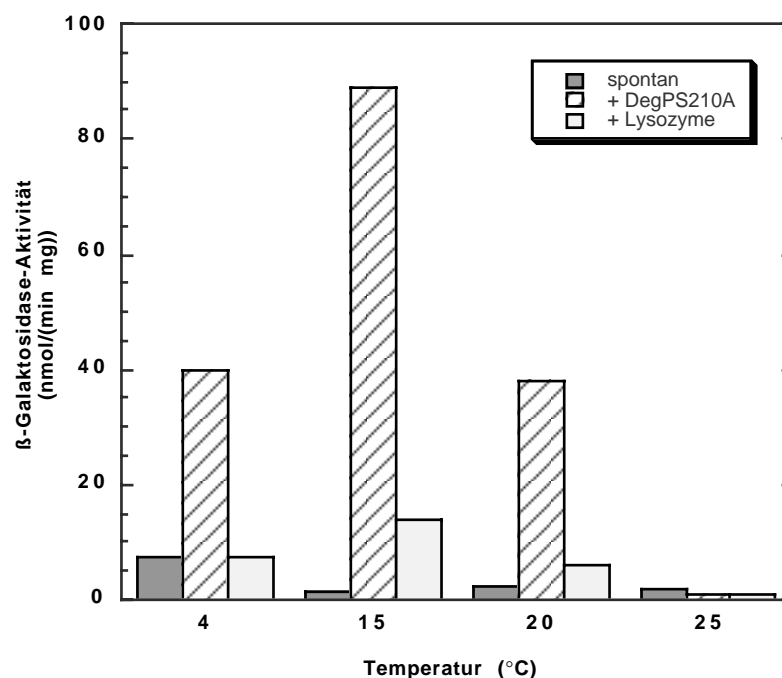


Abb. 4-24. Rückfaltung von chemisch denaturierter β -Galaktosidase bei unterschiedlichen Temperaturen.

Die Denaturierung der β -Galaktosidase erfolgte durch die Zugabe von Guanidiniumhydrochlorid zu einer Endkonzentration von 6 M und einer Inkubation für zwei Stunden bei Raumtemperatur. Die Renaturierung erfolgte durch eine 1:100 Verdünnung in Z-Puffer, der auf die jeweilige Temperatur vorgewärmt war und DegP_{S210A} bzw. Lysozym in äquimolarer Konzentration enthielt. Nach drei Minuten wurde ein Aliquot entnommen und die wiedergewonnene enzymatische Aktivität bestimmt. Die enzymatische Aktivität ist in nmol hydrolysiertem ONPG pro Minute und mg Protein bei Raumtemperatur angegeben. Die Aktivität der β -Galaktosidase vor der Denaturierung betrug 85 μ mol hydrolysiertes ONPG pro Minute und mg Protein.

Da eine Stimulation durch DegP_{S210A} nur bei Temperaturen, bei denen DegP proteolytisch inaktiv ist, festgestellt werden konnte, wurde auf den Einsatz von DegP verzichtet.

Die spontane Rückfaltung war bei allen getesteten Temperaturen gering (ca. 0,009 %). Eine Stimulation der Rückfaltung durch DegP_{S210A} war nur bei Temperaturen unterhalb 25 °C möglich. Bei einer Temperatur von 15 °C war der größte Effekt feststellbar. In Gegenwart von DegP_{S210A} war die Rückfaltung 45fach verbessert im Vergleich zu „spontaner“ Faltung, und es konnten 0,4 % der β -Galaktosidase gefaltet werden. Bei der Rückfaltung in Gegenwart des Kontrollproteins Lysozym war kein oder nur ein wesentlich geringerer Effekt beobachtbar.

Die β -Galaktosidase ist ein weiteres Substrat für die Chaperonaktivität von DegP.

4.7.3 Komplementation der Hitzesensitivität eines *degP*-Stammes durch DegP_{S210A}

degP-Stämme sind hitzesensitiv und können bei Temperaturen oberhalb 37 °C nur noch schlecht und oberhalb 42 °C nicht mehr wachsen, da die Zellen lysieren. Um einen Hinweis für die Chaperonaktivität von DegP *in vivo* zu erhalten, wurde untersucht, ob durch DegP_{S210A} der temperatursensitive Phänotyp komplementiert werden kann. Ein *degP*-Stamm, der *degP* bzw. *degP*_{S210A} von dem Plasmid pCS20 bzw. pCS21 exprimierte, wurde auf NZA-Agarplatten mit unterschiedlichen IPTG-Konzentrationen ausgestrichen und bei 42 °C inkubiert (Abbildung 4-25).

In der Abwesenheit von IPTG oder Konzentrationen unter 1 μ M war kein Wachstum möglich. Bei Konzentrationen von 10 μ M IPTG konnte durch eine Expression von *degP* die Temperatursensitivität aufgehoben werden. Das Wachstum entsprach einem Stamm mit chromosomaler *degP*-Expression. Der Stamm, der *degP*_{S210A} exprimierte, komplementierte den Phänotyp erst bei höheren IPTG-Konzentrationen (100 μ M). Bei starker Überexpression (1000 μ M) der beiden Proteine geht die Fähigkeit zur Komplementation wieder verloren. Die Chaperonaktivität von DegP_{S210A} ist ausreichend, um die Zelle vor den negativen Einflüssen des thermischen Faltungsstresses zu schützen.

Im Vergleich zur Expression von *degP* war eine höhere Expression von *degP*_{S210A} notwendig, um den hitzesensitiven Phänotyp zu komplementieren. Die Menge an DegP bzw. DegP_{S210A} wurde durch eine Quantifizierung von Western-Transfers bestimmt. Hierzu waren Zellen, die bei 44 °C gewachsen waren und *degP* bzw. *degP*_{S210A} von dem Plasmid pCS20 bzw. pCS21 exprimierten, benutzt worden. Die Expression von *degP* entsprach bei identischer IPTG-Konzentration der von *degP*_{S210A} (Daten nicht gezeigt). Bei der Induktion durch 50 μ M IPTG war die Expression ca. 3,5fach höher als bei 10 μ M IPTG. Hieraus läßt sich schließen, daß die proteolytische Aktivität von DegP einen größeren Einfluß auf das Wachstum bei erhöhten Temperaturen hat, wie seine Chaperonaktivität.

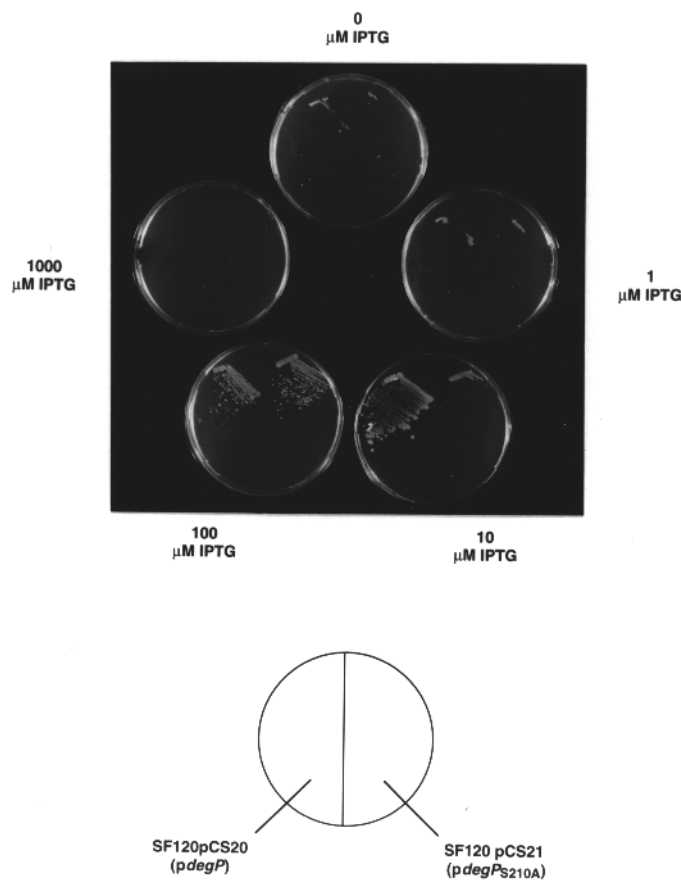


Abb. 4-25. Komplementation des hitzesensitiven Phänotyps eines *DegP*-Stammes durch *DegP* und *DegP*_{S210A}.

Der Stamm SF120pCS20 bzw. SF120pCS21 wurde auf NZA-Platten, die die entsprechende IPTG-Konzentration und 200 μg/ml Ampicillin enthielten, ausgestrichen und über Nacht bei 42 °C inkubiert.

4.8 Analyse der Struktur und Funktion von *DegP*

4.8.1 Charakterisierung durch *DegP*-Derivate mit Deletionen einzelner Domänen

4.8.1.1 Konstruktion der *DegP*-Derivate

Das Protein *DegP* besteht aus drei wichtigen Domänen: i) der katalytischen Domäne, ii) der PDZ1-Domäne und iii) der PDZ2-Domäne. Für eine Struktur-/Funktionsanalyse von *DegP* wurden Derivate von *degP* und *degP*_{S210A} kloniert, die das jeweilige Protein ohne PDZ1-, PDZ2- oder PDZ1+2-Domäne exprimierten. Ein weiteres Konstrukt exprimierte beide PDZ-Domänen allein. Zwei weitere Derivate von *degP* haben einen Aminosäureaustausch. Alle diese Plasmide sind Abkömmlinge von den Plasmiden pCS20 bzw. pCS21 und die Expression kann dadurch über IPTG fein reguliert werden. Die Konstruktion ist in den Kapiteln 3.7.8.6 bis 3.7.8.16 beschrieben. Alle Derivate haben N-terminal die Signalsequenz von

degP. Die exprimierten Proteine werden folglich in das Periplasma exportiert. Eine Zusammenfassung der Plasmide, die *degP*-Derivate kodieren, und die Namen der gereinigten Proteine findet sich in der Tabelle 4-22.

Tab. 4-22. DegP-Derivate: Plasmide, Namen der exprimierten Proteine und Charakteristika.

Die Konstruktion der einzelnen Plasmide ist in Kapitel 3.7.8 beschrieben.

Plasmid	Name des gereinigten Proteins	Bemerkung
pCS20	DegP	wt-DegP
pCS24	DegP _{E196K}	DegP mit Aminosäureaustausch E 196 K
pCS26	n. g.	DegP mit Aminosäureaustausch V 386 A
pIC1	PDZ ₁₊₂	PDZ1- und PDZ2-Domäne
pIW4	DegP _{ΔPDZ1,2}	DegP mit deletierter PDZ1- und PDZ2-Domäne
pIW5	DegP _{ΔPDZ2}	DegP mit deletierter PDZ2-Domäne
pIW6	i. E.	DegP mit deletierter PDZ2-Domäne
pIW7	DegP _{ΔPDZ1}	DegP mit deletierter PDZ1-Domäne
pCS21	DegP _{S210A}	DegP _{S210A}
pIW9	n. g.	DegP _{S210A} mit deletierter PDZ1- und PDZ2-Domäne
pIW10	n. g.	DegP _{S210A} mit deletierter PDZ2-Domäne
pIW11	i. E.	DegP _{S210A} mit deletierter PDZ2-Domäne
pIW12	n. g.	DegP _{S210A} mit deletierter PDZ1-Domäne

n. g.: nicht gereinigt

i. E.: instabile Expression

4.8.1.2 Expression und Reinigung der *degP*-Derivate

Die Expression von *degP* und *degP*_{S210A} und die Reinigung der beiden Proteine ist bereits im Kapitel 4.6.9.1 beschrieben, weshalb in diesem Kapitel nur die Expression und Reinigung der weiteren in Tabelle 4-22 aufgeführten Proteine beschrieben ist. Die Expression der Proteine für die Reinigung erfolgte in einem *degP*-Stamm, so daß die mögliche Bildung von gemischten Oligomeren mit DegP vermieden wurde. Am C-Terminus aller dieser Proteine befindet sich ein His-Tag, so daß die Proteine nach dem Aufschluß der Zellen durch eine French Press über eine Chromatographie mit Ni-NTA-Material gereinigt werden konnten (Kapitel 3.8.4.3). Eine Ausnahme bildet das Protein DegP_{ΔPDZ1,2}. Es konnte nicht über seinen His-Tag gereinigt werden; möglicherweise ist der His-Tag im Kern des Proteins verborgen. Deshalb erfolgte die Reinigung über einen kalten osmotischen Schock und eine Q-Sepharose-Säule (Kapitel 3.8.4.4).

Die Expression nach der Induktion mit IPTG und die Reinheit der gereinigten Proteine DegP_{E196K}¹, PDZ₁₊₂, DegP_{ΔPDZ1,2}, DegP_{ΔPDZ2} und DegP_{ΔPDZ1} ist in den Abbildungen 4-26 bis 4-29 dokumentiert. Nach der Ni-NTA-Säule lagen die Proteine zu > 95 % rein

¹ Die Reinigung des Proteins erfolgte durch Alexandra Beil, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Konstanz

vor, da keine weiteren Proteinbanden, die nicht Spaltprodukte der DegP-Derivate sind, auf einem mit Coomassie gefärbten SDS-Gel nachweisbar waren. Die Reinheit des Proteins DegP $_{\Delta PDZ1,2}$ betrug nach der Q-Sepharose-Säule lediglich ca. 80 %. Auf eine weitere Aufreinigung wurde aber verzichtet, da der Reinheitsgrad für die anschließenden Experimente ausreichend war. Alle Reinigungen wurden durch einen Western-Transfer mit α -Mals-Antiserum verifiziert (Daten nicht gezeigt). Das Protein PDZ $_{1+2}$ ist nicht durch das Antiserum erkannt worden.

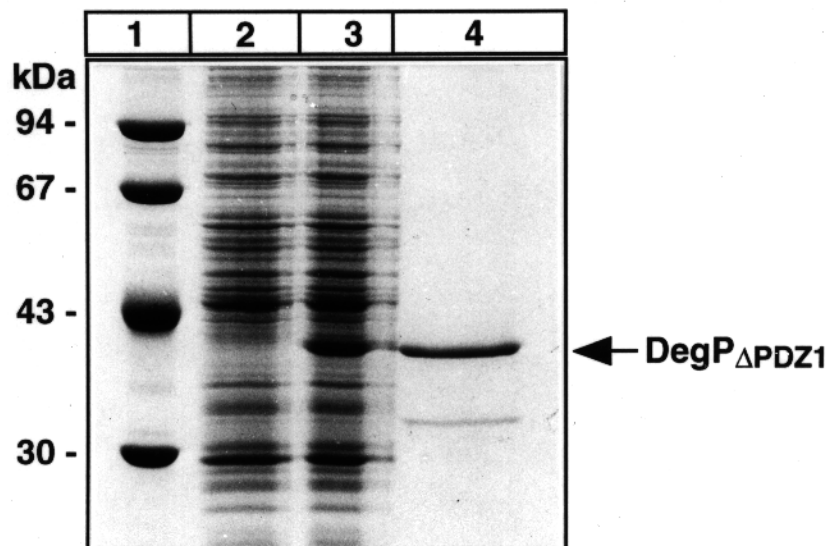


Abb. 4-26. SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins DegP $_{\Delta PDZ1}$.

Für die Reinigung von DegP $_{\Delta PDZ1}$ wurden die Zellen einer ausgewachsenen Kultur durch die French Press aufgeschlossen, zentrifugiert und der Überstand durch eine Säulenchromatographie mit Ni-NTA-Material aufgereinigt. Die Expression von *degP* $_{\Delta PDZ1}$ erfolgte nach der Induktion durch 10 μ M IPTG von dem Plasmid pIW7. Die Proben, jeweils 15 μ g Protein, wurden durch eine 10 %-ige reduzierende SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend mit Coomassie gefärbt.

1. Molekulargewichtsstandard; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pIW7, uninduziert; 3. Ganzzellextrakt von CLC198pIW7, induziert mit 10 μ M IPTG; 4. DegP $_{\Delta PDZ1}$ nach der Ni-NTA-Säule.

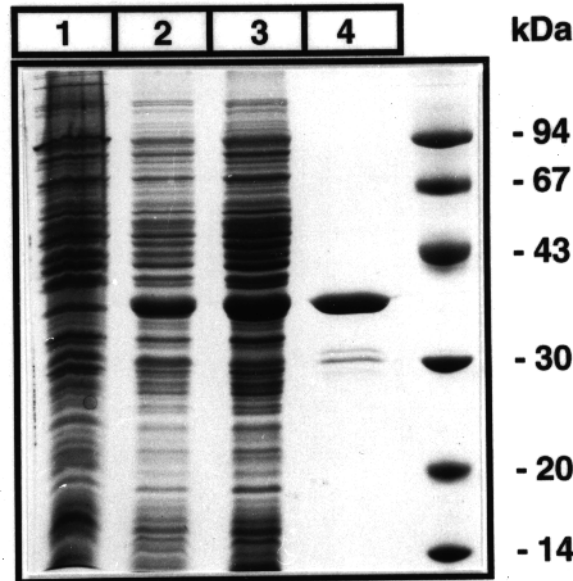


Abb. 4-27. SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins DegP_{ΔPDZ2}.

Für die Reinigung von DegP_{ΔPDZ2} wurde der Stamm CLC198pIW5 bei 28 °C gezogen. Die Expression von *degP_{ΔPDZ2}* erfolgte nach der Zugabe von IPTG zu einer Endkonzentration von 10 μM über Nacht. Das Protein ist, wie für Abbildung 4-26 beschrieben, gewonnen worden. Die Auftrennung von jeweils 15 μg Protein erfolgte durch ein reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel; die anschließende Anfärbung der Proteine durch Coomassie. 1. Ganzzellextrakt von CLC198; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pIW5, induziert mit 10 μM IPTG; 3. Überstand nach der French Press; 4. DegP_{ΔPDZ2} nach der Ni-NTA-Säule.

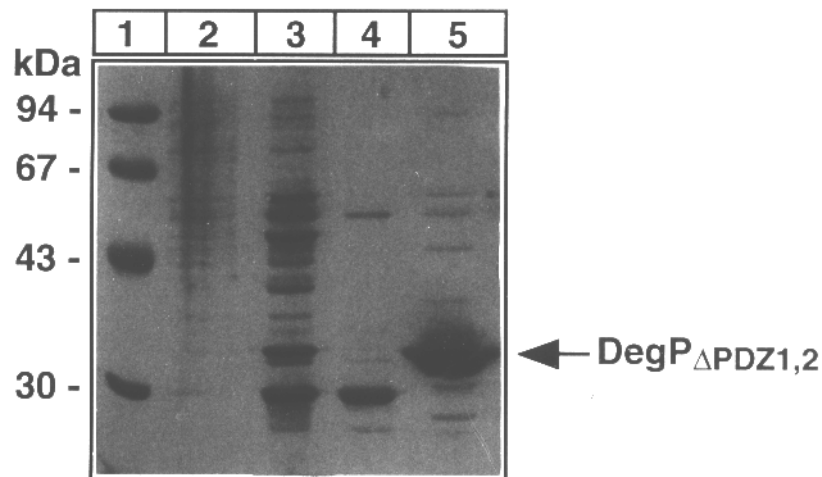


Abb. 4-28. SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins DegP_{ΔPDZ1,2}.

degP_{ΔPDZ1,2} ist in dem Stamm CLC198pIW4 nach Induktion durch 10 μM IPTG exprimiert worden. Nach der Überproduktion wurde das Protein durch einen kalten osmotischen Schock, eine Ammoniumsulfatfällung und eine Chromatographie mit Q-Sepharose aus den Zellen gereinigt. Die Auftrennung von je 10 μg Protein erfolgte durch eine 10 %-ige SDS-PAGE. Die aufgetrennten Proteine sind anschließend durch Coomassie angefärbt worden. 1. Molekulargewichtsstandard; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pIW4, induziert mit 10 μM IPTG; 3. Überstand des kalten osmotischen Schocks; 4. Durchlauf der Q-Sepharose Säule; 5. DegP_{ΔPDZ1,2} nach der Q-Sepharose-Säule.

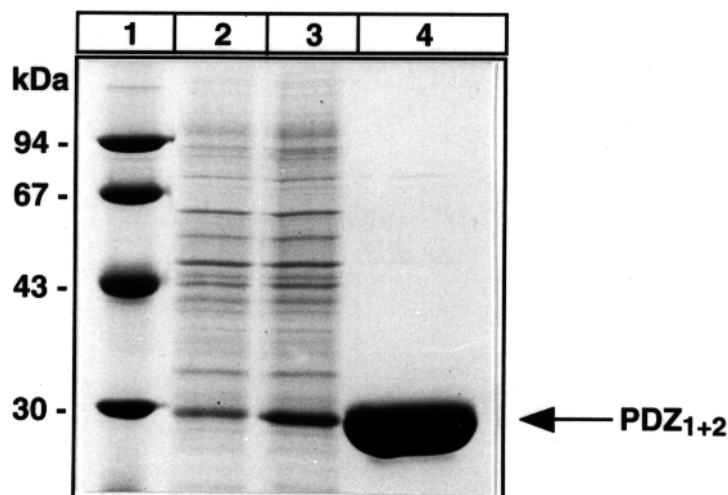


Abb. 4-29. SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins PDZ₁₊₂

Für die Reinigung von PDZ₁₊₂ wurde, wie für Abbildung 4-26 beschrieben, vorgegangen. Die Expression erfolgte durch Induktion mit 1 μ M IPTG von dem Plasmid pIC1. Die Auftrennung von 20 μ g gereinigtem Protein erfolgte durch eine 12 %-ige SDS-PAGE und nachfolgender Coomassiefärbung.

1. Molekulargewichtsstandard; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pIC1, uninduziert; 3. Ganzzellextrakt von CLC198pIC1, induziert mit 1 μ M IPTG; 4. PDZ₁₊₂ nach der Ni-NTA-Säule.

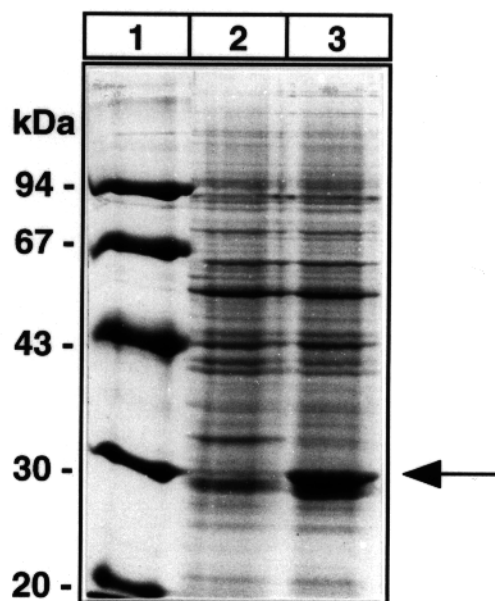


Abb. 4-30. SDS-PAGE der Überexpression eines instabilen *degP*_{S210A}-Derivats ohne PDZ2-Domäne vom Plasmid pIW11.

Die Abbildung zeigt die Expression eines *degP*_{S210A}-Derivates ohne PDZ2-Domäne vom Plasmid pIW11. Der Zellextrakt einer ausgewachsenen uninduzierten und induzierten Kultur wurde durch eine reduzierende 10 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Laufhöhe des überexprimierten Proteins ist durch einen Pfeil gekennzeichnet.

1. Molekulargewichtsstandard; 2. Ganzzellextrakt von DHB4pIW11, uninduziert; 3. Ganzzellextrakt von DHB4pIW11, induziert mit 1 mM IPTG.

Die Plasmide pIW6 und pIW11 tragen, ebenso wie die Plasmide pIW5 und pIW10 ein *degP*- bzw. *degP*_{S210A}-Gen, bei dem der für die PDZ2-Domäne kodierende Bereich deletiert ist. Der Fusionspunkt bei den Plasmiden pIW6 und pIW11 liegt 27 Basen 5' vor dem der Plasmide pIW5 und pIW10. Die exprimierten Proteine sollten deshalb lediglich 9 Aminosäuren kürzer sein. Sie können jedoch nicht in ihrer vollen Länge exprimiert werden. Sie sind instabil und werden gespalten, woraus ein Abbau-Fragment bei ca. 30 kDa resultiert. Die Proteine wurden deshalb nicht gereinigt. Das Laufverhalten der beiden Proteine auf einer SDS-PAGE ist identisch, weshalb in der Abbildung 4-30 nur die Expression vom Plasmid pIW11 gezeigt ist.

Die Plasmide pIW9, pIW10 und pIW12 wurden nur für *in vivo* Studien eingesetzt. Auf eine Reinigung der exprimierten Proteine konnte deshalb verzichtet werden. In der Abbildung 4-31 ist die Expression nach der Induktion mit IPTG sichtbar. Die exprimierten Proteine hatten alle das erwartete Molekulargewicht.

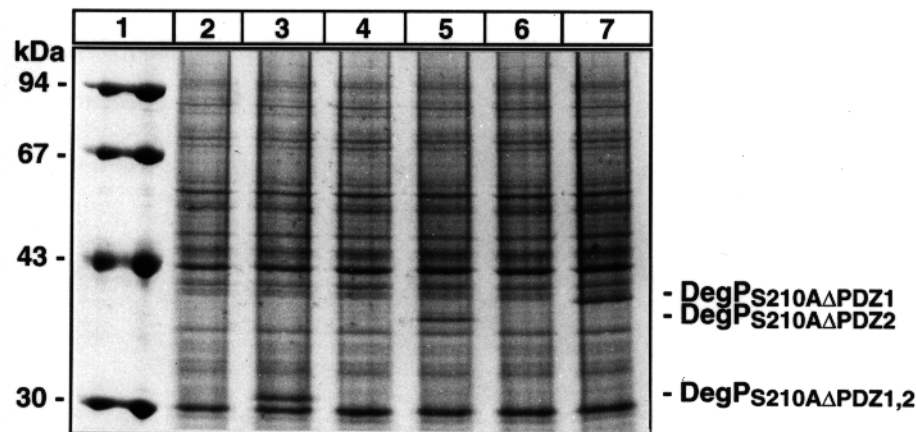


Abb. 4-31. SDS-PAGE der Expression von *degP*_{S210A}-Derivaten von den Plasmiden pIW9, pIW10 und pIW12.

Die Abbildung zeigt die Expression der *degP*_{S210A}-Derivate ohne PDZ1-, PDZ2- bzw. PDZ1,2-Domäne vom entsprechenden Plasmid. Der Zellextrakt einer ausgewachsenen uninduzierten und induzierten Kultur wurde durch eine reduzierende 10 %-ige SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie gefärbt. Die Laufhöhe der überexprimierten Proteine ist gekennzeichnet.

1. Molekulargewichtsstandard; 2. Ganzzellextrakt von CLC198pIW9, uninduziert; 3. Ganzzellextrakt von CLC198pIW9, induziert mit 1 mM IPTG; 4. Ganzzellextrakt von CLC198pIW10, uninduziert; 5. Ganzzellextrakt von CLC198pIW10, induziert mit 1 mM IPTG; 6. Ganzzellextrakt von CLC198pIW12, uninduziert; 7. Ganzzellextrakt von CLC198pIW12, induziert mit 1 mM IPTG..

4.8.1.3 Bestimmung des oligomeren Status der DegP-Derivate durch Gelfiltration

Anhand von Gelfiltrationsexperimenten war eine multimere Organisation von DegP erkannt worden (Kolmar et al., 1996). DegP liegt als Dodecamer, Hexamer und Trimer vor. Sind für die Oligomere von DegP die PDZ-Domänen von Bedeutung oder kann sich diese Struktur auch ohne die PDZ-Domänen ausbilden? Um diese Frage zu beantworten, wurde der Einfluß der PDZ-Domänen auf die Oligomerisierung durch eine Gelfiltration der gereinigten DegP-Derivate analysiert. Die so bestimmten Molekulargewichte der DegP-Derivate sind in der Tabelle 4-23 aufgeführt.

Tab. 4-23. Oligomerer Status der DegP-Derivate.

Das Molekulargewicht des jeweiligen Proteins (0,8 bis 3 mg/ml) wurde durch eine Gelfiltration mit einer Superdex200 HR 10/30 Säule bestimmt. Die Durchführung der Gelfiltration erfolgte bei Raumtemperatur mit 20 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl als Laufpuffer. Zur Eichung der Säule dienten die in der Tabelle 3-7 aufgelisteten Proteine.

Protein	Theoretische molekulare Masse des Monomers (in Da)	Molekulargewicht in der Gelfiltration (in Da)	Oligomere Form
DegP _{S210A}	47 879	539 770	12
		233 560	6
DegP _{E196K}	47 894	588 390	12
		285 000	6
DegP _{ΔPDZ1}	37 376	136 500	3
DegP _{ΔPDZ2}	37 832	41 200	1
DegP _{ΔPDZ1,2}	29 645	40 860	1
PDZ ₁₊₂	22 501	45 700	2

Der Austausch der Aminosäure S210A oder E196K zeigte keinen Verlust der höheren multimeren Organisation. Dodecamere und hexamere Form konnten bei beiden Mutanten beobachtet werden. Der Austausch E196K oder S210A scheint die dodecamere und hexamere Form zu stabilisieren, so daß kein Trimer wie bei DegP auftritt.

Der Verlust einer oder beider PDZ-Domänen zerstört die oligomere Organisation. Die Deletion der PDZ2-Domäne hatte zur Folge, daß sich keine Oligomere mehr bilden konnten. Das Derivat ohne PDZ1-Domäne konnte hingegen noch ein Trimer ausbilden. Eine Trimerisierung der DegP-Monomere wird somit über die PDZ2-Domäne gesteuert. DegP ohne PDZ-Domänen war nur noch als Monomer nachweisbar. Die PDZ-Domänen alleine bildeten ein Dimer.

Die Gelfiltrationsexperimente haben gezeigt, daß die PDZ-Domänen essentiell für die oligomere Organisation des DegP-Moleküls sind. Die Ausbildung eines Trimers wird über die PDZ2-Domäne gesteuert. Für eine weitere Oligomerisierung über Dimerisierung der Trimere sind die PDZ1- und PDZ2-Domäne notwendig.

4.8.1.4 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität der DegP-Derivate durch Resorufin-markiertes Casein¹

Die Deletion einer oder beider PDZ-Domänen zerstörte die multimere Organisation von DegP. Sind die PDZ-Domänen aber auch wichtig für die enzymatische Aktivität von DegP? Die proteolytische Aktivität wurde mit dem Substrat Resorufin-markiertes Casein quantifiziert und ist in der Tabelle 4-24 angegeben.

Tab. 4-24. Proteolytische Aktivität der DegP-Derivate durch Spaltung von Resorufinmarkiertem Casein.

Die proteolytische Aktivität der DegP-Derivate wurde bestimmt, indem 5 µg Protein mit Resorufin-markiertem Casein zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt wurde. Die Reaktion fand in 175 mM Tris/HCl, pH 8,0 statt. Die proteolytische Aktivität von 100 % entspricht bei 37 °C 0,39 nmol gespaltenes Resorufin-markiertes Casein pro Minute und mg Protein.

Protein	Proteolytische Aktivität (in %)
DegP	100
DegP _{E196K}	7*
DegP _{ΔPDZ1}	5 [∇]
DegP _{ΔPDZ2}	5
DegP _{ΔPDZ1,2}	0

*: Ab 32 °C starke Reduktion der proteolytischen Aktivität.

∇: Ab 37 °C Verlust der proteolytischen Aktivität.

Nach der Deletion einer oder beider PDZ-Domänen war die proteolytische Aktivität stark reduziert oder gar nicht mehr vorhanden. DegP_{ΔPDZ1} war temperatursensitiv und hatte ab 37 °C keine proteolytische Aktivität mehr. Bei einer Inkubationstemperatur von 30 °C war die höchste Restaktivität meßbar und betrug 5 % im Vergleich zu DegP bei dieser Temperatur. Die Deletion der PDZ2-Domäne hatte keine Temperatursensitivität zur Folge, die proteolytische Aktivität des Proteins DegP_{ΔPDZ2} war über den gesamten Temperaturbereich um 5 % reduziert im Vergleich zu DegP. Bei dem Protein DegP_{ΔPDZ1,2} konnte bei keiner Temperatur eine proteolytische Aktivität bestimmt werden. Die Deletion beider PDZ-Domänen führte zu einem vollständigen Verlust der Proteasefunktion.

Die Punktmutante DegP_{E196K} hatte noch 7 % der Aktivität von DegP. Auch dieses Protein war temperatursensitiv. Nach dem Erreichen der maximalen Aktivität bei einer Temperatur von 32 °C war eine drastische Reduktion der proteolytischen Aktivität feststellbar.

4.8.1.5 Chaperonaktivität der DegP-Derivate

Um den Beitrag der einzelnen PDZ-Domänen für die Chaperonaktivität von DegP zu analysieren, wurde die Faltung von ΔssMalS in Anwesenheit der verschiedenen DegP-Konstrukte untersucht. Hierfür wurde die MalS-Aktivität nach einer Faltung in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der DegP-Derivate bestimmt und graphisch aufgetragen (Abbildung 4-32).

¹ Diese Experimente wurden von Alexandra Beil, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Konstanz durchgeführt.

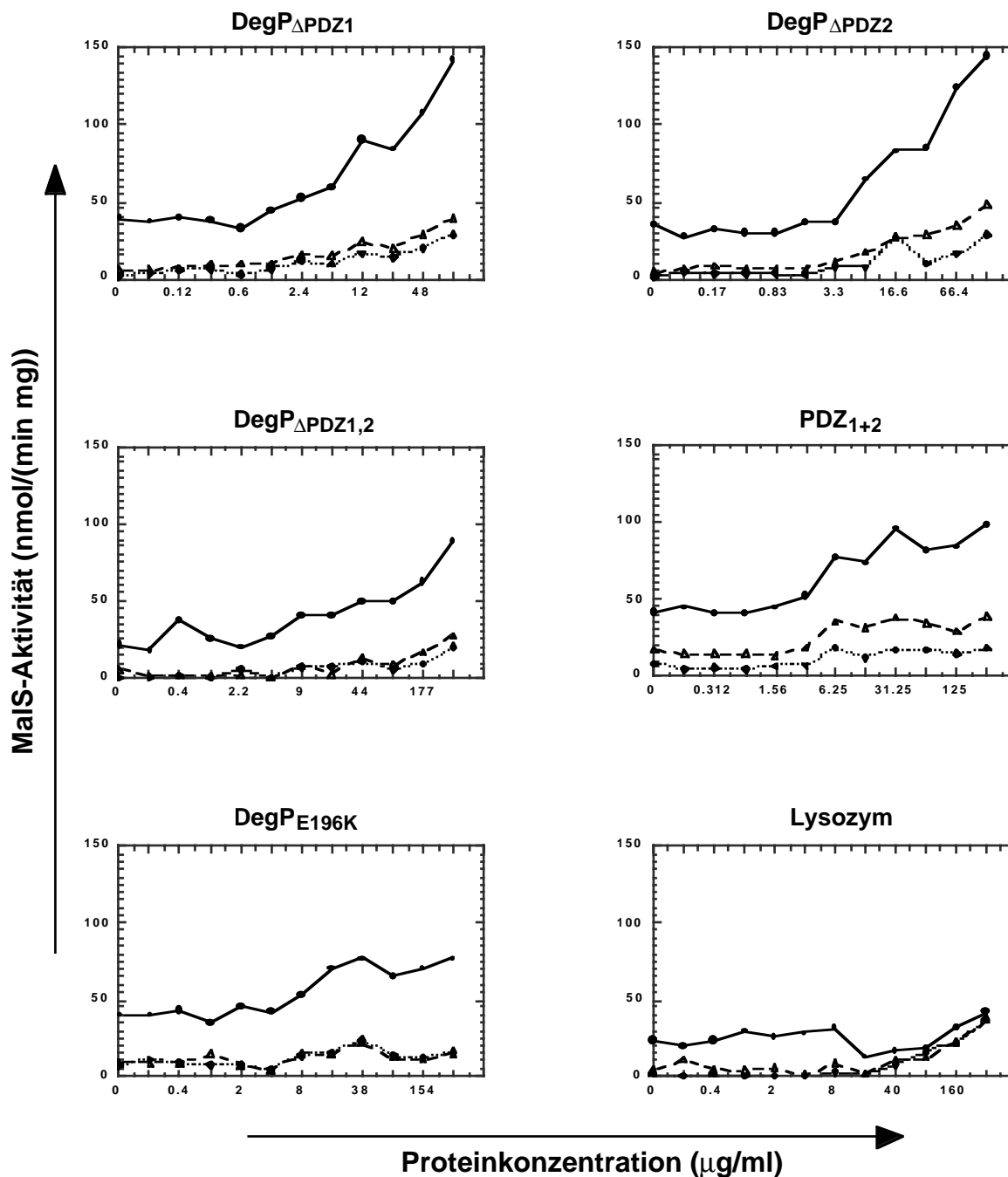


Abb. 4-32. Faltung von Δ ssMaIS in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der DegP-Derivate.

Die Faltung von Δ ssMaIS (0,13 µg) wurde durch ein Verdünnen des Proteins 1:25 in 50 mM Tris/HCl, pH 8,0, das auf 28 °C (●), 37 °C (◆) bzw. 42 °C (Δ) vorgewärmt war und das jeweilige DegP-Derivat in der entsprechenden Konzentration enthielt. Die Bestimmung der wiedergewonnenen MaIS-Aktivität erfolgte mit dem Substrat PG-6 und ist in nmol hydrolysiertem PG-6 pro Minute und mg Δ ssMaIS bei Raumtemperatur angegeben.

Die Proteine DegP Δ PDZ1 und DegP Δ PDZ2 zeigten eine Chaperonaktivität, die der Aktivität von DegP S_{210A} entsprach. Bei 28 °C fand, innerhalb des gemessenen Konzentrationsbereiches, eine Steigerung der Rückfaltungseffizienz um das maximal 4fache statt. Dies ist nur geringfügig niedriger als die Stimulation durch DegP S_{210A} . Bei 37 °C bzw. 42 °C war die Effizienz ebenfalls mit DegP S_{210A} vergleichbar, da die Ausbeute um das 8- bzw. 15fache (DegP Δ PDZ1) und 12- bzw. 15fache (DegP Δ PDZ2) verbessert war.

In Gegenwart von DegP $_{\Delta PDZ1,2}$ war die Stimulation der Faltung zu höheren Proteinkonzentrationen verschoben. Die Ausbeute war jedoch vergleichbar, und die Faltung konnte bei 28 °C um das maximal 4fache gesteigert werden. Auch bei 37 °C und 42 °C waren höhere DegP $_{\Delta PDZ1,2}$ -Konzentrationen notwendig, um die Faltung zu unterstützen. Die Chaperonaktivität war somit im Vergleich zu DegP $_{S210A}$, DegP $_{\Delta PDZ1}$ und DegP $_{\Delta PDZ2}$ verschlechtert.

Die PDZ-Domänen alleine, PDZ $_{1+2}$ hatten keine Chaperonaktivität. Bei 28 °C war die Faltung von Δ ssMalS um das maximal 2fache verbessert. Auch bei 37 °C und 42 °C war keine höhere Effizienz meßbar. Diese Steigerungen entsprechen der Kontrolle mit Lysozym.

Die Punktmutante DegP $_{E196K}$ wies ebenfalls keine Chaperonaktivität auf. Bei allen drei getesteten Temperaturen konnte durch DegP $_{E196K}$ die Ausbeute nur um das 2fache gesteigert werden.

Um Effekte durch eine unspezifische Proteinwechselwirkung auszuschließen, wurde Lysozym getestet. Es hatte bei 28 °C keinerlei Einfluß auf die Faltung und zeigte erst bei sehr hohen Konzentrationen einen geringen Effekt, so daß die Faltung um das 2fache gesteigert werden konnte. Bei 37 °C und 42 °C war ein Einfluß ebenfalls erst bei hohen Lysozymkonzentrationen meßbar. Da die Faltung aber nur bei sehr hohen Proteinkonzentrationen unterstützt wurde, war dies nicht mit DegP $_{S210A}$ vergleichbar.

4.8.1.6 Komplementation der Hitzesensitivität eines *degP*-Phänotyps durch die DegP-Derivate

Die Funktion der DegP-Derivate kann *in vivo* über die Komplementation eines *degP*-Phänotyps untersucht werden. Der Test erfolgte, indem ein *degP*-Stamm, der die verschiedenen *degP*-Konstrukte von dem jeweiligen Plasmid exprimiert, auf NZA-Platten ausgestrichen und bei 44 °C über Nacht inkubiert wurde. Die Induktion der Expression erfolgte durch unterschiedliche IPTG-Konzentrationen, die den Platten beigemischt waren. Die Komplementation der einzelnen Konstrukte ist in Tabelle 4-25 zusammengefaßt.

Die Deletion der PDZ1-Domäne von DegP (DegP $_{\Delta PDZ1}$) hat einen Verlust der Komplementation zur Folge. Nachdem DegP $_{\Delta PDZ1}$ bei Temperaturen über 37 °C keine proteolytische Aktivität mehr hat (Kapitel 4.8.1.4), ist die Komplementation bei 44 °C nicht über die Protease-Funktion möglich. Die Chaperonaktivität von DegP $_{\Delta PDZ1}$ ist nicht ausreichend, um die Hitzesensitivität aufzuheben. Die Deletion der PDZ2-Domäne in DegP (DegP $_{\Delta PDZ2}$) reduzierte die Fähigkeit, die Hitzesensitivität zu komplementieren. Das Wachstum der Stämme war zu höheren IPTG-Konzentrationen im Vergleich zu DegP verschoben, und es konnte kein vollständiges Aufheben der Hitzesensitivität erreicht werden. Eine größere Proteinmenge war für die Komplementation erforderlich. Sind beide PDZ-Domänen deletiert (DegP $_{\Delta PDZ1,2}$), war eine Komplementation nicht möglich. Dies war zu erwarten, da die Deletion der PDZ1-Domäne bereits zu einem Verlust der Komplementation führte.

Die Punktmutante DegP $_{S210A}$ komplementierte, wie auch in Kapitel 4.7.3 beschrieben, den *degP*-Phänotyp erst bei höheren Proteinmengen. Nach der Deletion einer oder beider PDZ-Domänen von DegP $_{S210A}$ war eine Komplementation der Hitzesensitivität nicht mehr möglich. Lediglich kleine Einzellkolonien wurden nach der Expression von DegP $_{S210A\Delta PDZ1,2}$ beobachtet.

Die Punktmutante DegP $_{V386K}$ konnte den hitzesensitiven Phänotyp wie DegP komplementieren. Die Mutation scheint keinen Einfluß auf die Funktion des Proteins zu haben. Dies

ist auch der Grund, weshalb das Protein nicht gereinigt und wie die anderen Derivate *in vitro* charakterisiert wurde. Die Punktmutante DegP_{E196K} konnte die Hitzesensitivität nicht aufheben. Dieses Ergebnis stimmt mit den *in vitro* Experimenten überein. Das Protein DegP_{E196K} hatte keine Chaperonaktivität, und die proteolytische Aktivität war sehr gering bei erhöhter Temperatur.

Die PDZ-Domänen alleine (PDZ₁₊₂) konnten nicht komplementieren, was auch aufgrund ihrer nicht vorhandenen Protease- und Chaperonaktivität anzunehmen war.

Tab. 4-25. Komplementation des *degP*-Phänotyps durch verschiedene DegP-Derivate.

Der Stamm CLC198, der das jeweilige Plasmid enthielt, wurde auf NZA-Platten mit 200 µg/ml Ampicillin und der entsprechenden IPTG-Konzentration ausgestrichen und über Nacht bei 44 °C inkubiert.

Plasmid	exprimiertes Protein	IPTG-Konzentration in der Platte (in µM)						
		0	1	10	50	100	500	1000
pCS19	-	-	-	-	-	-	-	-
pCS20	DegP	-	++	+++	++	++	-	-
pIW7	DegP _{ΔPDZ1}	-	-	-	-	-	-	-
pIW5	DegP _{ΔPDZ2}	-	-	-	+	++	-	-
pIW4	DegP _{ΔPDZ1,2}	-	-	-	-	-	-	-
pCS24	DegP _{E196K}	-	-	-	-	-	-	-
pCS26	DegP _{V386K}	-	+	+++	+	++	-	-
pCS21	DegP _{S210A}	-	-	-	++	+	-	-
pIW12	DegP _{S210A;ΔPDZ1}	-	-	-	-	-	-	-
pIW10	DegP _{S210A;ΔPDZ2}	-	-	-	-	-	-	-
pIW9	DegP _{S210A;ΔPDZ1,2}	-	-	+	-	+	-	-
pIC1	PDZ ₁₊₂	-	-	-	-	-	-	-

-: kein Wachstum

+: kleine Einzellkolonien

++: Einzellkolonien

+++ : Wachstumsdefekt vollständig komplementiert

4.8.2 Elektronenmikroskopie von DegP¹

Um eine Information über die Struktur von DegP zu erhalten, wurden Präparate von gereinigtem DegP_{S210A} für die Transmissions-Elektronenmikroskopie hergestellt. Für die Präparation wurde DegP_{S210A} anstelle von DegP ausgewählt, weil die Punktmutante stabiler ist und sich nicht durch eine Autoproteolyse abbaut. Die komplexe Struktur von DegP sollte auch in der Punktmutante erhalten sein, da das Protein i) das gleiche Elutionsverhalten bei einer Gelfiltrationschromatographie zeigt wie DegP und ii) die Sekundärstruktur nicht verändert wird (Skórko-Glonek et al., 1995b). Ferner hatten die Vorexperimente mit beiden Proteinen ergeben, daß die Präparate von DegP_{S210A} eine größere Homogenität aufwiesen.

¹ Die Elektronenmikroskopie von DegP_{S210A} wurde in Zusammenarbeit mit Günter Pfeifer (Abteilung Molekulare Strukturbiologie, Max-Planck-Institut für Biochemie, Martinsried) am Max-Planck-Institut durchgeführt.

Die Präparation erfolgte mit einer Proteinlösung, die direkt nach der Elution von der Ni-NTA-Säule noch über eine Gelfiltration weiter aufgereinigt war. Nach der Gelfiltration ist nur die Fraktion ausgewählt worden, die den Dodecameren entsprechen sollte. Die Abbildung 4-33 zeigt Aufnahmen von negativkontrastierten Präparaten.

Die Präparate in der Abbildung 4-33 (a) und (b) zeigen die globuläre Struktur von DegP_{S210A}. Bei einzelnen Partikeln ist in der zweidimensionalen Projektion das Auftreten einer dreizähligen Symmetrie zu beobachten (Abbildung 4-33 (a) Pfeilspitzen und (c)). Das Material ist aber nicht homogen genug, um eine detaillierte Strukturaufklärung durchzuführen.

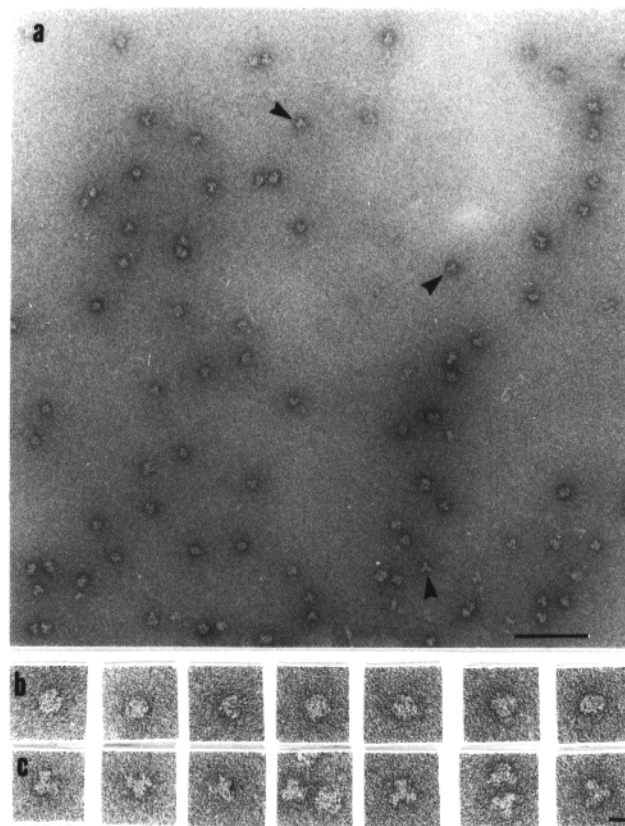


Abb. 4-33. Elektronenmikroskopie von DegP_{S210A}.

Für die Transmissions-Elektronenmikroskopie von isoliertem DegP_{S210A} wurden Präparate durch eine Negativkontrastierung hergestellt. Die Bildserien (b) und (c) zeigen ausgewählte Partikel aus der Übersicht (a). Die Marker in (a) und (c) entsprechen 10 bzw. 1 nm.

4.8.3 Sekundärstrukturvorhersage von DegP

Über die Sekundärstruktur von DegP war über CD-Spektroskopie bislang nur bekannt, daß es größtenteils aus β -Strängen besteht (Skórko-Glonek et al., 1995a). Um eine detaillierte

Information über die wahrscheinliche Sekundärstruktur zu erhalten, wurde eine Vorhersage mit dem Computerprogramm 'PHD' durchgeführt. Die Vorhersage beruht auf einem Vergleich homologer Proteine und auf einer daran anschließenden Sekundärstrukturvorhersage auf Basis der Homologiedaten. Die Abbildung 4-34 zeigt die vorausgesagte Sekundärstruktur von reifem DegP.

AS1.....2.....3.....4.....5.....6
AS	AETSSATTAQQMPSLAPMLEKVMPSVVSINVEGSTTVNTPRMPRNFQQFFGDDSPFCQEG
Sec	LLLLLLLLLLLLLLLLHHHHHHHHHHHEEEEEEEEEEEELLLLLLHHHHHHLLLLLLLLLLLL
AS7.....8.....9.....10...*.....11.....12
AS	SPFQSSPFCQGGQGGNGGGQQQKFMALGSGVIIDADKGYVVTNNHVVDNATVIKVLSDG
Sec	LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLEEEELLEEELLEEELLLLLEEEHHHHHLLLLLEEEEL
AS13...*.....14.....15.....16.....17.....18
AS	RKFDAKMGKDPKSDIALIQIQNPKNLTAIKMADSDALRVGDYTVVAIGNPFGLGETVTSG
Sec	LEEEEEEELLLLHHHEEEEEEEELLLLLLEEEELLLLLLLLLLLLLLEEEEEEELLLLLL•EEEE
AS19.....20.....*.....22.....23.....24
AS	IVSALGRSGLNAENYENFIQTDAAINRGNSSGALVNLNGELIGINTAILAPDGCNIGIGF
Sec	EEEEEEELLLLLLLLLLLLLLEEEELLLLLLLLLLLLLHHHH•LLLLLEEEEEEELLLLLLEEE
AS25.....26.....27.....28.....29.....30
AS	AIPSNMVKNLTSQMVVEYGOVKRDELGIMGTELNSELAKAMKVDAQRGAFVSVQVLPNSSAA
Sec	ELHHHHHHHHHHHHHHHLLLEEEEEEELLLLLLHHHHHHHLLLLLLLLLEEEEEEELLLLLL
AS31.....32.....33.....34.....35.....36
AS	KAGIKAGDVITSLNGKPISSFAALRAQVGTMPVGSKLTLGLLRDQKQVNVNLELQQSSQN
Sec	LLLLLLLLLEEEEEEELLLLLLHHHHHHHHHH•LLLLLEEEEEEELLLLLLEEEEEEELLLLL
AS37.....38.....39.....40.....41.....42
AS	QVDSSSIFNGIEGAEMSNKKGKQGVVNVNKTGTTPAAQIGLKKGDVVIIGANQQAVKNIAE
Sec	LLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLLEEEEEEELLLLLHHHHHLLLLLEEEELHHHHHHHHH
AS43.....44.....
AS	LRKVLDSKPSVLALNIQRGDSTIYLLMQ
Sec	HHHHHLLLLLEEEEEEELLLLLLEEEEEEEL

Abb. 4-34. Sekundärstrukturvorhersage von reifem DegP.

Die Sekundärstrukturvorhersage ist mit dem Computerprogramm 'PHD' erstellt worden. Die Aminosäuresequenz (AS) ist der Sekundärstrukturvorhersage (Sec) gegenübergestellt. Für die Sekundärstrukturvorhersage wurden die Symbole H für helikale Bereiche, E für β -Stränge und L für Schleifen gewählt. Die Aminosäuren für die keine zuverlässige Vorhersage gemacht werden konnte, sind mit • gekennzeichnet. Die katalytische Triade ist durch * markiert.

Nach der Sekundärstrukturvorhersage über 'PHD' sind in DegP helikale Bereiche und β -Stränge gleichermaßen vertreten. In der Domäne unbekannter Funktion (Aminosäure 1 bis 49) sind alle drei Sekundärstrukturelemente gleichermaßen vertreten. Der Q-Linker (Aminosäure 50 bis 82) besteht aus einer einzigen großen Schleife mit einer Länge von 32 Aminosäuren. Interessant ist die Lokalisation der Aminosäuren der HDS-Triade innerhalb der katalytischen Domäne (zwischen Q-Linker und PDZ1-Domäne). Während das Histidin-105 und das Aspartat-135 in einer helikalen Region liegen, befindet sich das Serin-210 in einer Schleife. Das Histidin und Aspartat sind daher räumlich fixiert, wohingegen das Serin in einem flexiblen Bereich lokalisiert ist. Innerhalb der katalytischen Domäne dominieren β -Stränge, die von Schleifen unterbrochen werden. Lediglich drei sehr kurze helikale Bereiche wurden vorhergesagt. Eine lange Helix findet sich erst im Übergang in die

4.9 Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP *in vitro*

4.9.1 Abbau von MalS durch DegP

4.9.1.1 Ungefaltetes reduziertes MalS

Nachdem falsch gefaltetes MalS *in vivo* in einem *degP*-Stamm stabilisiert wird (Kapitel 4.5.5.1) und der Abbau des Proteins durch DegP katalysiert scheint, sollte die Aktivität durch Koinkubation von reduziertem und ungefaltetem MalS mit DegP und DegP_{S210A} als Kontrolle *in vitro* nachgewiesen werden. Die Faltung von Δ ssMalS war durch Zugabe von reduzierenden Agenzien unterbunden. Nach einer Inkubationszeit von einer bzw. fünf Stunden bei der entsprechenden Temperatur wurde das Protein gefällt und mittels einer SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 4-37).

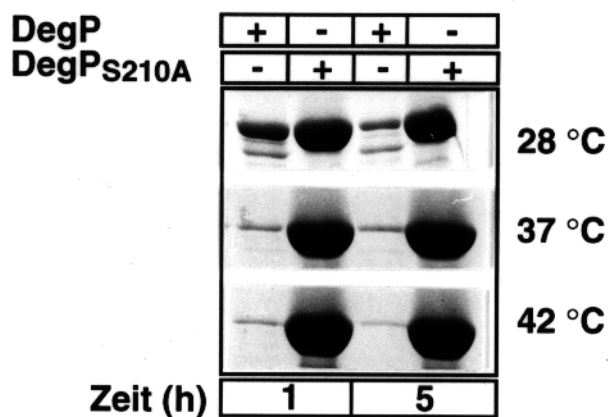


Abb. 4-37. Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch DegP.

Nach dem Verdünnen von 7 μ g Δ ssMalS 1:25 in 100 mM Tris/HCl pH 8,7; 10 mM DTT wurden äquimolare Mengen an DegP bzw. DegP_{S210A} zugefügt und bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Die Reaktion fand für eine bzw. fünf Stunden statt. Anschließend wurde das Protein durch TCA gefällt und mit einem reduzierenden 10 %-igen SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde mit Coomassie gefärbt.

Bei einer Proteolysetemperatur von 37 °C oder 42 °C war der Abbau sehr schnell und effizient. Das MalS wurde nahezu vollständig abgebaut, und keine Spaltprodukte konnten auf dem Gel beobachtet werden. Der Abbau bei 28 °C war wesentlich langsamer und ineffizienter, da ein Abbauprodukt beobachtet werden konnte. Ungefaltetes reduziertes MalS ist ein Substrat der Protease DegP. Als Kontrolle war DegP durch DegP_{S210A} ersetzt. Hier war keine proteolytische Aktivität nachweisbar.

4.9.1.2 Natives MalS

Erkennt DegP nur falsch oder ungefaltetes MalS als Substrat oder wird auch natives MalS durch DegP abgebaut? Um diese Frage zu beantworten wurde natives MalS mit äquimolaren Mengen an DegP bei 37 °C inkubiert.

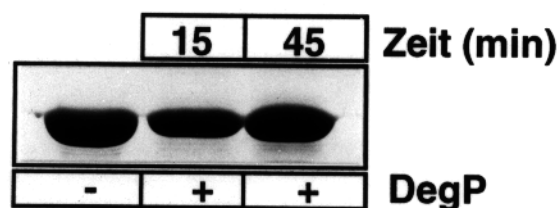


Abb. 4-38. Abbau von nativem MalS durch DegP.

15 µg MalS wurden mit einer äquimolaren Menge an DegP versetzt und für 15 bzw. 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion fand in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5; 150 mM NaCl statt. Das Protein ist anschließend durch TCA gefällt und durch ein nicht-reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel, das mit Coomassie gefärbt wurde, aufgetrennt worden.

Innerhalb von 45 Minuten konnte kein Abbau des nativen MalS durch DegP beobachtet werden (Abbildung 4-38). Die MalS-Menge ist in Gegenwart von DegP stabil und entspricht dem Ansatz ohne eine Zugabe von DegP. Auch nach einer auf 18 Stunden verlängerten Inkubationszeit konnte keine Proteolyse festgestellt werden (Daten nicht gezeigt). DegP kann folglich zwischen nativem MalS und ungefaltetem reduziertem MalS unterscheiden; es fand kein Abbau des nativen MalS statt.

4.9.1.3 Gefaltetes reduziertes MalS

Eine Reduktion der Disulfidbrücken von nativem MalS führt zur Aggregation des Proteins (Kapitel 4.1.2.7 und 4.2.1). Möglicherweise wird der über eine Disulfidbrücke mit der Amylasedomäne verknüpfte N-Terminus exponiert, wodurch eine Aggregation vermittelt wird. Die Struktur von MalS muß stark verändert sein. Dies könnte einen Angriffspunkt für DegP darstellen. Deswegen wurde natives MalS reduziert und der Abbau durch DegP untersucht (Abbildung 4-39).

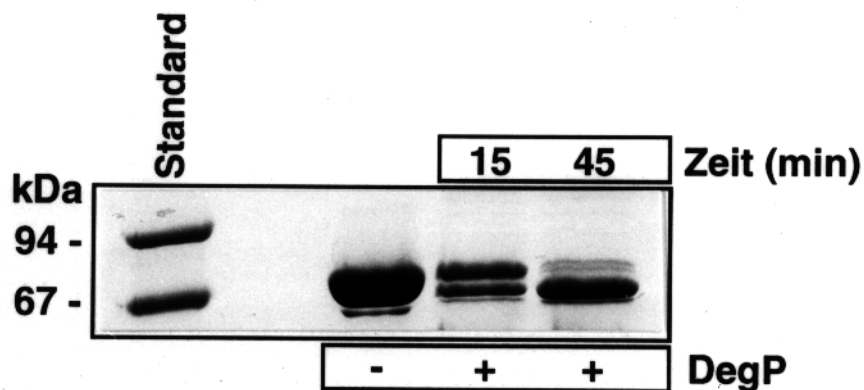


Abb. 4-39. Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch DegP.

15 μ g MalS wurde durch die Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 100 mM und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur reduziert. DegP wurde in äquimolarer Konzentration zu MalS zugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 15 bzw. 45 Minuten inkubiert. Nach dem Fällen des Proteins mit TCA erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels einer reduzierenden 10 %-igen SDS-PAGE. Die Anfärbung der Proteine auf dem Gel fand mit Coomassie statt.

Nach der Reduktion der Disulfidbrücken von nativem MalS war das Protein sensitiv gegenüber der Proteolyse durch DegP. Das MalS wurde dabei zunächst in ein Abbaufragment gespalten, das dann einer weiteren Proteolyse unterliegt. Nach 15 Minuten waren zwei Banden zu erkennen. Die höhermolekulare wird nach weiteren 30 Minuten vollständig in die niedermolekulare überführt. Eine Fortsetzung der Proteolyse über 15 Stunden führte zu einem vollständigen Abbau auch dieses Fragments (Abbildung 4-42). Weitere Abbaubanden waren auf dem Gel nicht erkennbar. Auch auf einem Western-Transfer (nicht gezeigt), der mit α -MalS-Antiserum entwickelt wurde, waren keine Abbauprodukte nachweisbar.

Die Reduktion der Disulfidbrücken muß die native Struktur von MalS so zerstören, daß ein Abbau durch die Protease DegP ermöglicht wird.

4.9.2 Abbau von MalS durch die DegP-Derivate

4.9.2.1 Ungefaltetes reduziertem MalS

Der Abbau von ungefaltetem reduziertem Δ ssMalS durch die DegP-Derivate wurde bei 37 °C untersucht (Abbildung 4-40). Die Faltung von Δ ssMalS war durch eine Zugabe von DTT unterbunden worden. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten war ein Abbau nur in Gegenwart von DegP feststellbar. In keinem der Ansätze der DegP-Derivate konnte eine Proteolyse festgestellt werden. Nach der Inkubation der Ansätze für 15,5 Stunden war eine Proteolyse nicht nur bei DegP feststellbar. DegP $_{\Delta$ PDZ2 baute Δ ssMalS nahezu vollständig ab. In Gegenwart von DegP $_{\Delta$ PDZ1 war die Δ ssMalS-Menge gering und in Gegenwart von DegP $_{E196K}$ stark reduziert. DegP $_{\Delta$ PDZ1,2 zeigte keinerlei proteolytische Aktivität. Der geringe MalS-Abbau durch DegP $_{\Delta$ PDZ1 ist durch die Temperatursensitivität des Proteins erklärbar.

Die Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP Δ PDZ1 durch Resorufin-markiertes Casein (Kapitel 4.8.1.4) zeigte, daß das Protein bei 37 °C keine proteolytische Aktivität mehr aufweist. Der Abbau von Δ ssMalS durch die DegP-Derivate ist somit wesentlich langsamer als bei DegP, aber die Proteine können ungefaltetes reduziertes MalS als Substrat noch erkennen.

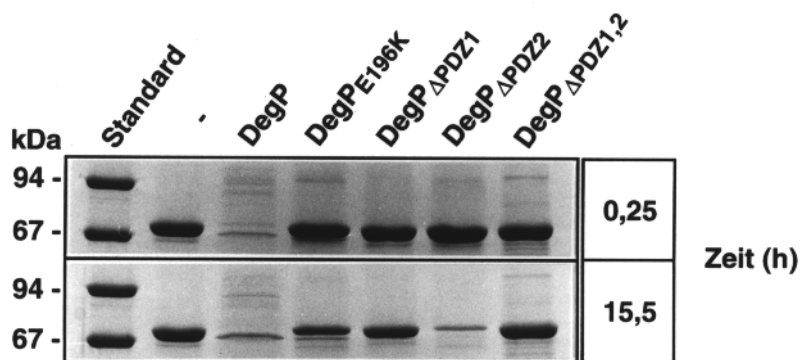


Abb. 4-40. Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch die DegP-Derivate.

15 μ g Δ ssMalS wurden 1:25 in 100 mM Tris/HCl, pH 8,7; 20 mM DTT verdünnt, das jeweilige DegP-Derivat in äquimolarer Konzentration zugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 15 Minuten bzw. 15,5 Stunden inkubiert. Nach dem Fällen des Proteins mit TCA erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels einer reduzierenden 10 %-igen SDS-PAGE. Die Anfärbung der Proteine auf dem Gel fand mit Coomassie statt.

4.9.2.2 Natives MalS

Die Proteolyse von nativem MalS durch die DegP-Derivate wurde nur mit den Proteinen DegP^{E196K}, DegP Δ PDZ1 und DegP Δ PDZ2 getestet. Die Koinkubation äquimolarer Mengen von MalS und des DegP-Derivats fand bei 37 °C statt. Das Protein wurde nach der Proteolysezeit gefällt und durch ein SDS-Gel aufgetrennt (Abbildung 4-41).

Keines der Derivate baute natives MalS ab. Die Proteinmenge war im Vergleich zur Kontrolle ohne zugesetzte Protease nicht reduziert. Eine falsche Erkennung der Substrate durch die DegP-Derivate findet nicht statt; es werden keine nativen Proteine abgebaut.

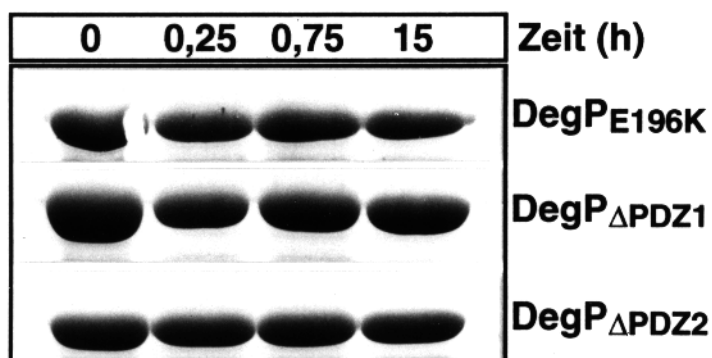


Abb. 4-41. Abbau von nativem MalS durch die DegP-Derivate.

15 μ g MalS wurden mit einer äquimolaren Menge des jeweiligen DegP-Derivats versetzt und für 15 bzw. 45 Minuten oder 15 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion fand in 50 mM Tris/HCl, pH 7,5 statt. Das verbliebene Protein ist anschließend durch TCA gefällt und durch ein nicht-reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel, das mit Coomassie gefärbt wurde, aufgetrennt worden.

4.9.2.3 Gefaltetes reduziertes MalS

Nachdem natives MalS nach Reduktion der Disulfidbrücken für DegP zugänglich wird (Kapitel 4.9.1.3), wurde auch die Proteolyse durch die DegP-Derivate DegP_{E196K}, DegP_{ΔPDZ1} und DegP_{ΔPDZ2} getestet (Abbildung 4-42).

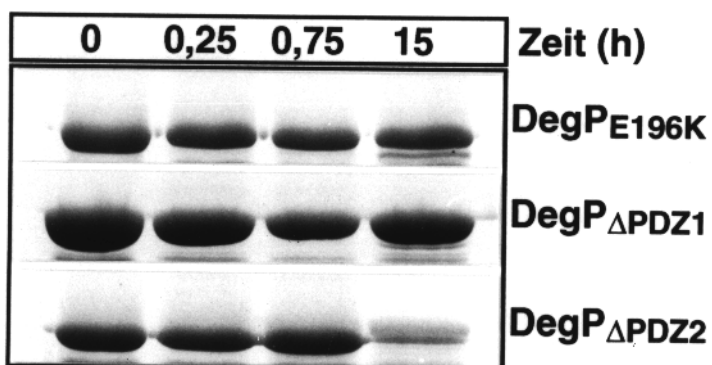


Abb. 4-42. Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch DegP-Derivate bei 37 °C.

15 μ g MalS wurde durch die Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 100 mM und fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur reduziert. DegP wurde in äquimolarer Konzentration zugefügt und der Ansatz bei 37 °C für 15 oder 45 Minuten bzw. 15 Stunden inkubiert. Nach dem Fällen des Proteins mit TCA erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels einer reduzierenden 10 %-igen SDS-PAGE. Die Anfärbung der Proteine auf dem Gel fand mit Coomassie statt.

Nach dem Öffnen der Disulfidbrücken von nativem MalS wird das Protein nur durch DegP_{ΔPDZ2} abgebaut. DegP_{ΔPDZ1} ist bei 37 °C proteolytisch inaktiv. Dieses Ergebnis entspricht mit Ausnahme von DegP_{E196K} dem Abbau von reduziertem ungefaltetem ΔssMalS. Bei 37°C erkennt DegP_{E196K} reduziertes ungefaltetes MalS, nicht aber reduziertes gefaltetes MalS als Substrat. Der Unterschied muß auf der Konformation des Substrats beruhen, und da die proteolytische Aktivität von DegP_{E196K} bei 37 °C stark reduziert ist, wird nur stark entfaltetes Substrat abgebaut.

4.9.3 Synthetische Peptide als Substrat von DegP

Das Substrat Resorufin-markiertes Casein weist einige Nachteile auf: i) das Casein ist nicht gleichmäßig mit Resorufin markiert, ii) die Sekundär- und Tertiärstruktur des Caseins können einen unberechenbaren Einfluß auf die Spaltung haben und iii) das Casein könnte seine Struktur temperaturabhängig verändern, so daß die Temperaturabhängigkeit der Spaltung vom Substrat und nicht von DegP abhängt. Um diese Punkte auszuschließen, wurde die Spaltung von Oligopeptiden untersucht. Hierfür wurden zwei kurzkettige Peptide (Suc-AAPV-pNA und Suc-AAV-pNA) und zwei langkettige (MDVIKKKHWWQSDALKW-SVLGLLGLLVGYLVV und CLTLIHKFENLYFQSAAAILVYKSQ) ausgewählt. Die Peptide sind so kurz gewählt, daß sie keine Tertiärstruktur ausbilden und deshalb bei allen Temperaturen in der gleichen Konformation vorliegen. Da bekannt ist, daß bei DegP eine Spezifität für Valin in der P1-Position vorliegt (Kolmar et al., 1996), wurde darauf geachtet, daß diese Voraussetzung für eine Spaltung gegeben ist.

Bei keinem der Peptide konnte eine Spaltung durch DegP festgestellt werden.

4.9.4 Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität von DegP

4.9.4.1 Spaltung von Resorufin-markiertem Casein¹

Die bisherigen Ergebnisse lassen vermuten, daß die Chaperonaktivität von DegP bei einer Temperaturerhöhung von der Proteaseaktivität überlagert wird. Um die proteolytische Aktivität von DegP *in vitro* bei verschiedenen Temperaturen zu quantifizieren, wurde die Aktivität durch das Substrat Resorufin-markiertes Casein in der Abhängigkeit der Temperatur bestimmt. Es war ein Temperaturbereich von 4 °C bis 42 °C getestet worden. Die proteolytische Aktivität von DegP in der Abhängigkeit von der Temperatur ist in der Abbildung 4-43 graphisch dargestellt.

Unterhalb einer Temperatur von 22 °C war DegP proteolytisch inaktiv. Bei 28 °C war die DegP-Aktivität 8-mal geringer als bei 42 °C. Der Hauptanstieg der proteolytischen Aktivität wurde zwischen 32 °C und 42 °C beobachtet. Die Spaltung von Resorufin-markiertem Casein durch DegP ist stark von der Temperatur abhängig.

¹ Dieses Experiment wurde von Alexandra Beil, Lehrstuhl für Mikrobiologie, Universität Konstanz durchgeführt (Beil, 1999).

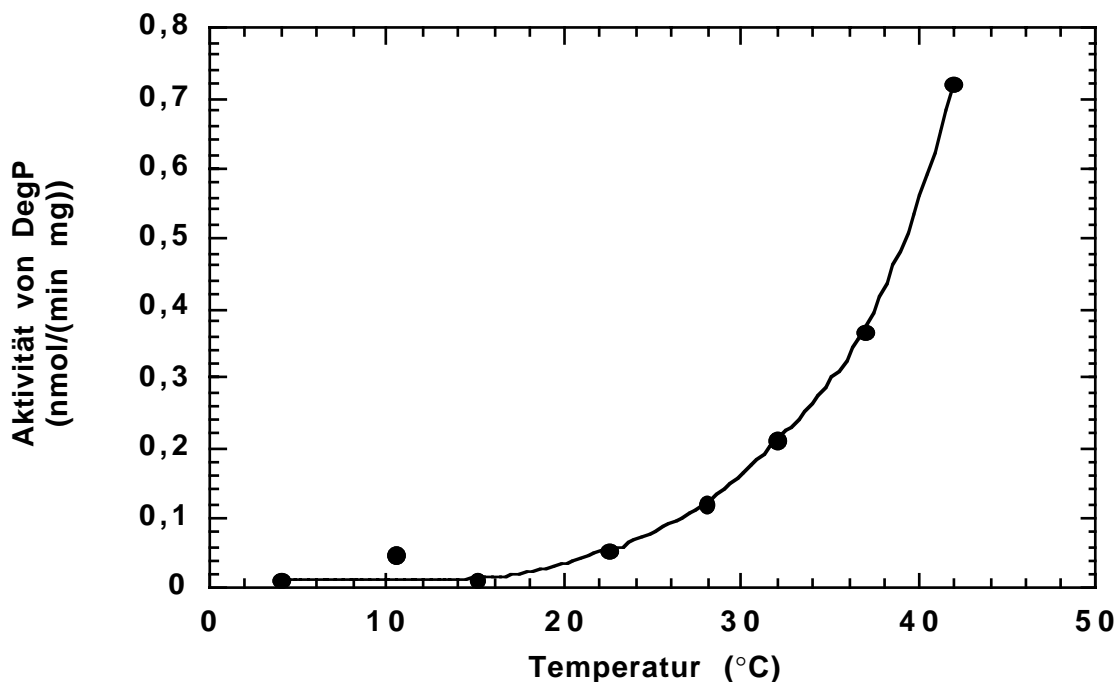


Abb. 4-43. Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität von DegP durch Resorufin-markiertes Casein.

Die proteolytische Aktivität von DegP wurde bestimmt, indem 5 μg DegP bei der entsprechenden Temperatur mit Resorufin-markiertem Casein zu einer Endkonzentration von 1 mg/ml versetzt wurde. Die Reaktion fand in 175 mM Tris/HCl, pH 8,0 statt. Die proteolytische Aktivität ist in nmol gespaltenes Casein pro Minute und mg DegP angegeben.

4.9.4.2 Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch DegP

Nachdem die Spaltung von Resorufin-markiertem Casein durch DegP temperaturabhängig war (Kapitel 4.9.4.1), bestand die Frage, ob dies auch für das natürliche Substrat MalS zutrifft. Hierfür wurde der Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS über den gleichen Temperaturbereich wie bei der Spaltung von Resorufin-markiertem Casein bestimmt, indem reduziert und ungefaltetes ΔssMalS bei unterschiedlichen Temperaturen mit DegP inkubiert wurde. Die Faltung von ΔssMalS war durch die Zugabe von DTT verhindert worden. Nach einer Reaktionsdauer von 15 bzw. 45 Minuten wurde das verbliebene Protein ausgefällt und durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 4-44).

Die Reaktion war sehr schnell, und so konnte zwischen 15- und 45-minütigem Abbau kein großer Unterschied festgestellt werden. Bis zu einer Temperatur von 15 °C konnte kein Abbau von ΔssMalS nachgewiesen werden. Oberhalb dieser Temperatur war eine Proteolyse feststellbar, die ab 28 °C drastisch zunahm.

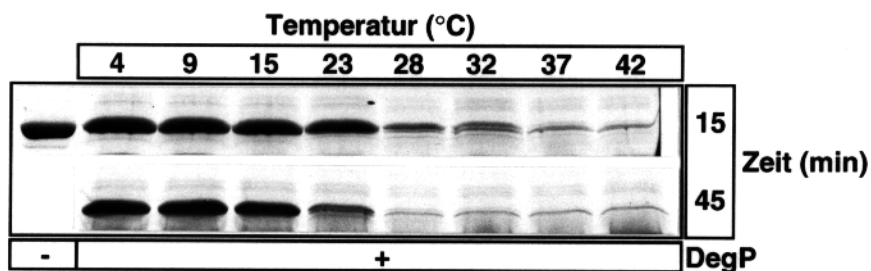


Abb. 4-44. SDS-PAGE von Δ ssMalS nach dem Abbau durch DegP bei unterschiedlichen Temperaturen.

15 μ g Δ ssMalS wurden mit einer äquimolaren Menge an DegP versetzt und in einem Puffer von 100 mM Tris/HCl, pH 8,7; 20 mM DTT für 15 bzw. 45 bei der entsprechenden Temperatur inkubiert. Das verbliebene Protein wurde mit TCA ausgefällt und auf ein reduzierendes 10 %-iges SDS-Gel geladen, das mit Coomassie angefärbt wurde.

Eine Quantifizierung der verbliebenen Proteinmenge von Δ ssMalS nach einem Abbau durch DegP zeigte einen deutlichen Anstieg der proteolytischen Aktivität in Abhängigkeit von der Temperatur (Abbildung 4-45). Die Proteolyse setzte erst ab Temperaturen über 15 °C ein. Zwischen 22,5 °C und 28 °C ist ein deutlicher Sprung. Die Temperaturerhöhung von 5,5 °C bewirkte eine Steigerung des Abbaus um das Doppelte. Auch oberhalb dieser Temperatur nahm der Abbau weiter zu, und bei 42 °C war das Δ ssMalS bis auf 5 % abgebaut.

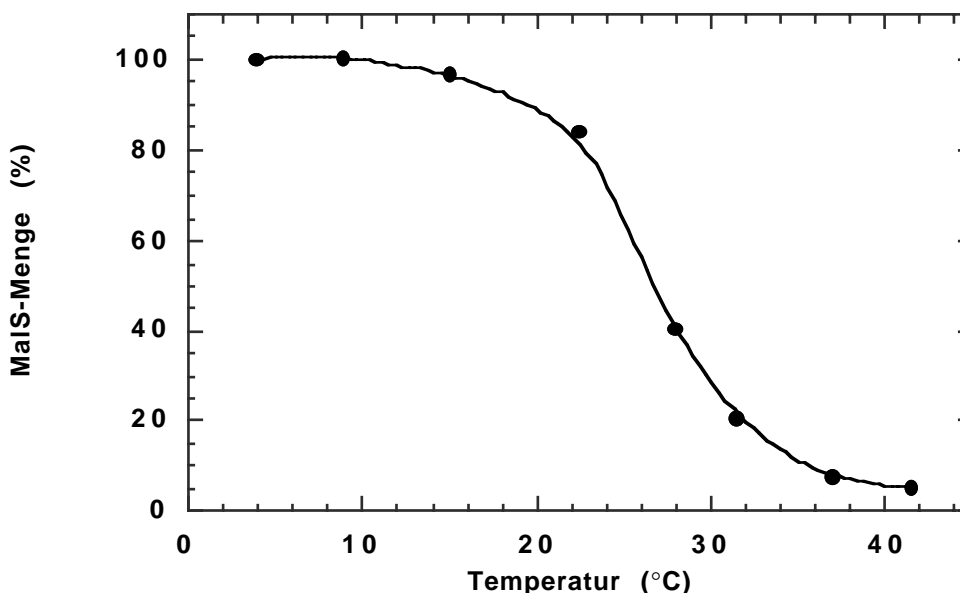


Abb. 4-45. Temperaturabhängigkeit des Δ ssMalS-Abbaus durch DegP.

Die Menge an Δ ssMalS nach einem 15-minütigen Abbau durch DegP wurde von Abbildung 4-44 quantifiziert und graphisch gegen die Inkubationstemperatur aufgetragen. Die Bestimmung der Proteinmenge erfolgte relativ zu dem Ansatz dem kein DegP zugesetzt war. Eine MalS-Menge von 100 % entspricht der Menge des Ansatzes ohne eine DegP-Zugabe.

4.9.4.3 Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch DegP und die DegP-Derivate

Da die proteolytische Aktivität von DegP und seinen Derivaten von der Temperatur abhängig ist, wurde die Proteolyse von gefaltetem reduziertem MalS durch DegP und die DegP-Derivate auch bei 32 °C und 42 °C getestet. Die Reaktion fand für 14 Stunden statt. Nach Fällen des Proteins wurde das Protein durch eine SDS-PAGE aufgetrennt (Abbildung 4-46).

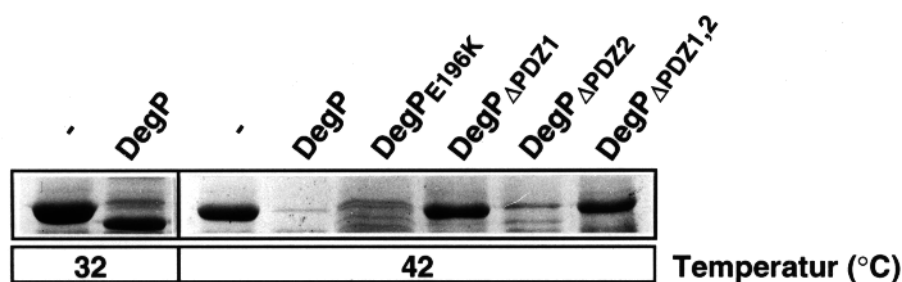


Abb. 4-46. Abbau von gefaltetem reduziertem MalS bei 32 °C und 42 °C durch DegP und die DegP-Derivate.

15 µg MalS wurde durch die Zugabe von DTT zu einer Endkonzentration von 100 mM und eine fünfminütige Inkubation bei Raumtemperatur reduziert. DegP und seine Derivate wurden in äquimolarer Konzentration zugefügt und der Ansatz bei 32 °C bzw. 42 °C für 14 Stunden inkubiert. Nach dem Fällen des Proteins mit TCA erfolgte die Auftrennung der Proteine mittels einer reduzierenden 10 %-igen SDS-PAGE. Die Anfärbung der Proteine auf dem Gel fand mit Coomassie statt.

Bei einer Temperatur von 32 °C ist ein Abbau nur bei dem Ansatz mit DegP zu beobachten. Die proteolytische Aktivität der DegP-Derivate ist bei 32 °C zu gering. Der Abbau durch DegP ist inkomplett, da ein hochmolekulares Spaltprodukt beobachtet wurde. Reduziertes gefaltetes MalS scheint ein schlechteres Substrat zu sein als ungefaltetes reduziert MalS, da hier ein wesentlich effizienterer Abbau bei niedrigen Temperaturen stattfand (Kapitel 4.9.4.2).

Die Spaltung bei 42 °C ist wesentlich effektiver. Durch DegP, DegP^{E196K} und DegP^{ΔPDZ2} fand ein vollständiger Abbau von MalS statt. Es konnten keine Abbauprodukte nachgewiesen werden. DegP^{ΔPDZ1,2} war proteolytisch inaktiv, und es konnte kein Abbau beobachtet werden. Durch DegP^{ΔPDZ1} fand ebenfalls kein Abbau statt, da dieses DegP-Derivat temperatursensitiv ist und bei Temperaturen über 37 °C keine proteolytische Aktivität mehr aufweist.

4.9.4.4 Tyrosin-Fluoreszenz von DegP in Abhängigkeit von der Temperatur

Die proteolytische Aktivität von DegP ist stark von der Temperatur abhängig. Um zu untersuchen, ob die Temperaturabhängigkeit auf DegP selbst beruht, ist Fluoreszenzspektroskopie mit dem gereinigten DegP durchgeführt worden. DegP enthält keine Tryptophan-Reste, aber fünf Tyrosin-Reste. Die Anregung fand bei $\lambda = 280$ nm statt; die Emission wurde bei $\lambda = 306$ nm gemessen und graphisch gegen die Temperatur aufgetragen (Abbildung 4-47).

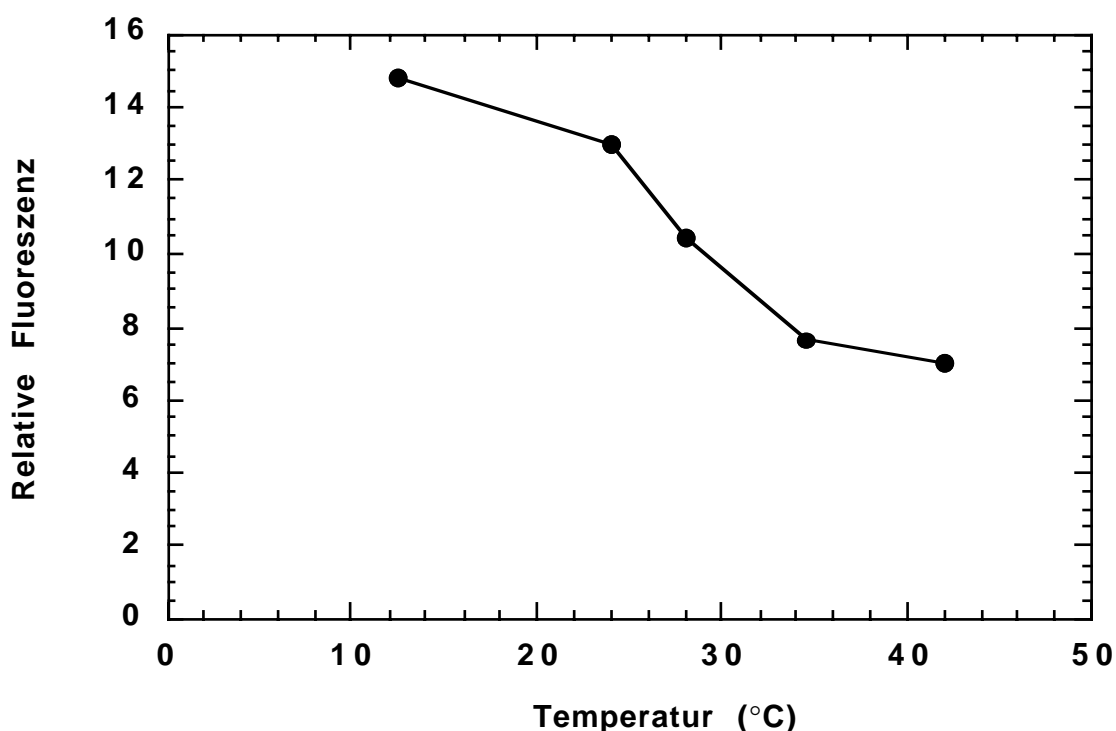


Abb. 4-47. Fluoreszenz-Spektrum von DegP.

Die Ermittlung der fluoreszenzspektroskopischen Daten von DegP erfolgte in 50 mM Tris/HCl, pH 8,7. Die Anregungswellenlänge betrug $\lambda = 280$ nm und das Emissionsspektrum wurde von $\lambda = 200$ nm bis 420 nm mit einem Perkin Elmer LS 650-40 Spektralfluorimeter bei der jeweiligen Temperatur aufgezeichnet. Die DegP spezifische Emissionswellenlänge betrug $\lambda = 308$ nm.

Die Änderung des Emissionsspektrums war nicht linear über den gemessenen Temperaturbereich. Die größte Änderung konnte bei Temperaturen beobachtet werden, bei denen die Proteaseaktivität induziert wurde. Ein erster Knick trat bei 22 °C (dem Beginn der proteolytischen Aktivität) auf und ein weiterer konnte bei 32 °C beobachtet werden (ab 32 °C findet ein drastischer Anstieg der proteolytischen Aktivität statt). DegP unterliegt somit einer temperaturabhängigen Konformationsänderung. Diese Strukturänderung könnte die Proteaseaktivität andrehen und dadurch die Chaperonaktivität überlagern.

5. DISKUSSION

5.1 Biochemische Charakterisierung und Struktur der α -Amylase MalS

Für die Charakterisierung von MalS wurde der für das Protein in der Literatur beschriebene Reinigungsprozeß (Freundlieb et al., 1988) optimiert und erheblich vereinfacht. Dies geschah durch die Wahl eines anderen Bakterienstammes für die Reinigung und eine modifizierte Reinigungsprozedur, die weniger Schritte erfordert. Dadurch ist eine schnellere und schonendere Reinigung von MalS möglich.

Nachdem die Substratspezifität für MalS bereits bekannt war (Freundlieb und Boos, 1986), wurden die Stabilität und die Struktur von MalS näher untersucht.

Nach dem Entzug der gebundenen zweiwertigen Kationen von MalS mit dem Chelator EDTA konnte die Abhängigkeit der enzymatischen Aktivität von zweiwertigen Ionen nachgewiesen werden. Die Titration mit unterschiedlichen Ionen zeigte, daß eine vollständige Reaktivierung der Ausgangsaktivität nur durch Ca^{2+} erfolgen konnte. Durch Mg^{2+} und Mn^{2+} fand nur eine unvollständige und durch Zn^{2+} keine Reaktivierung statt. Dieses Ergebnis bestätigt die durch eine Sequenzhomologie postulierte Ca^{2+} -Bindestelle im Amylasekörper von MalS (Schneider et al., 1992) und reiht das Enzym in die Gruppe der Ca^{2+} -stabilisierten α -Amylasen ein. Durch Ba^{2+} fand eine Stimulation statt. Dies wurde bereits für ein anderes Enzym beobachtet, der Methanol Dehydrogenase aus *Methylobacterium extorquens* (Goodwin und Anthony, 1996). Hier wird durch den Austausch von Ba^{2+} durch Ca^{2+} eine Veränderung der Konformation des aktiven Zentrums herbeigeführt, wodurch die freie Energie der Substratbindung und damit auch die Aktivierungsenergie herabgesetzt werden. Auf diesem Effekt könnte auch die Stimulation der MalS-Aktivität beruhen.

Das pH-Optimum von MalS liegt im alkalischen Bereich. Im sauren pH-Bereich findet ein drastischer Verlust der enzymatischen Aktivität statt. Die Stabilität der Enzymaktivität gegenüber hohen Salzkonzentrationen und SDS wurde studiert. Die enzymatische Aktivität wurde durch hochosmolare Bedingungen nur wenig beeinflusst. Die Zugabe von NaCl bis zu einer Endkonzentration von 1 M reduzierte kontinuierlich die enzymatische Aktivität auf einen Endwert von lediglich ca. 50 %. MalS weist nicht die für eine pilzliche α -Amylase (Arakawa et al., 1992) beschriebene Resistenz gegenüber dem Detergens SDS auf. Durch eine steigende SDS-Konzentration trat ein vollständiger Verlust der enzymatischen Aktivität von MalS ein, der durch eine Denaturierung des Proteins durch SDS zu erklären ist. MalS weist zwar eine Stabilität gegenüber hohen Salzkonzentrationen auf, ist jedoch sensitiv gegenüber SDS.

Das Pseudooligosaccharid Acarbose ist kein geeigneter Inhibitor für MalS. Die Affinität der Acarbose an MalS zu binden war so schwach, daß für eine effektive Hemmung Acarbosekonzentrationen notwendig waren, die fünfmal höher waren als die PG-6-Substratkonzentrationen.

Mit dem Substrat PG-6 wurde für MalS eine K_M von 49 μM und eine v_{max} von 0,36 $\mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein bestimmt. Diese Werte weichen von denen durch Freundlieb et al. (Freundlieb et al., 1988) bestimmten ab. Dies könnte auf der veränderten Reinigung und auch auf den unterschiedlichen Puffersystemen für die Bestimmung der enzymatischen Parameter beruhen. Die Wahl eines neutralen pH-Wertes und Phosphatpuffers durch Freundlieb et

al. stellte, wie die biochemische Charakterisierung von MalS zeigte, kein optimales Puffersystem dar.

Anhand von den massenspektrometrischen Messungen und der analytischen Ultrazentrifugation konnte der monomere Status von MalS bis in den mikromolaren Bereich nachgewiesen werden. Die elektronenmikroskopischen Aufnahmen zeigten, daß MalS ein globuläres Protein ist. Die feinere Struktur von MalS kann als ein kurzer Hohlzylinder mit einer lateralen Öffnung beschrieben werden. In der zweidimensionalen Projektion des elektronenmikroskopischen Bildes erscheint die Aufsicht des Moleküls in der Form eines Hufeisens. Dies erinnert an das Aussehen der Amylopullulanase aus *Bacillus* (Hatada et al., 1996) und der Glycoamylase aus *Clostridium thermosaccharolyticum* (Specka und Mayer, 1993). Die Glycoamylase ist ebenfalls ein monomeres Enzym (Specka et al., 1991).

MalS ist ein globuläres, monomeres Enzym, das Ca^{2+} gebunden hat. Die enzymatische Aktivität ist stark vom pH-Wert abhängig. MalS zeigt eine Stabilität gegenüber hohen Salzkonzentrationen, nicht jedoch gegenüber dem Detergens SDS. Mit PG-6 als Substrat wurden eine K_M von $49 \mu\text{M}$ und eine v_{max} von $0,36 \mu\text{mol}/\text{min}$ pro mg Protein bestimmt.

5.2 Bedeutung der Disulfidbrücken in MalS für die Faltung

MalS enthält vier Cysteine. Durch die Massenspektrometrie konnten zwei Disulfidbrücken in MalS identifiziert werden. Zwischen Cystein-40 und Cystein-58 ist eine „kleine“ und zwischen Cystein-104 und Cystein-520 ist eine „große“ Disulfidbrücke lokalisiert. Der Redoxstatus des Proteins kann auf einem SDS-Gel beobachtet werden: unter reduzierenden Bedingungen wandert MalS bei seinem theoretischen Molekulargewicht, und unter oxidierenden Bedingungen ist die apparente Masse zu höherem Molekulargewicht verschoben. Dies ist ungewöhnlich, da ein Protein normalerweise nach der Ausbildung einer Disulfidbrücke eine kompaktere Struktur aufweist und in der SDS-PAGE eine geringere apparente Masse aufweist als unter reduzierenden Bedingungen. Inzwischen wurde dieses ungewöhnliche Laufverhalten bei einem weiteren Protein, dem Hsp33 aus *E. coli*, beobachtet (Jacob et al., 1999). Der Grund für dieses veränderte Laufverhalten bei MalS ist nicht bekannt; eine posttranslationale Modifikation kann jedoch aufgrund der massenspektrometrischen Daten ausgeschlossen werden. Möglich ist, daß nach der Reduktion der Disulfidbrücken hydrophobe Elemente exponiert werden, die eine verstärkte Anlagerung von SDS ermöglichen.

Nach einer Reduktion der Disulfidbrücken wird die native Struktur von MalS zerstört. Durch die elektronenmikroskopischen Aufnahmen und die Sedimentationsexperimente konnte eine Aggregation zu großen Komplexen nachgewiesen werden. Trotz dieser Strukturveränderung bleibt die enzymatische Aktivität erhalten. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken von nativem MalS wird die für die enzymatische Aktivität notwendige Struktur des aktiven Zentrums nicht beeinflusst. Die Denaturierung findet wahrscheinlich nur am N-Terminus statt.

MalS hat am N-Terminus eine Erweiterung von ca. 200 Aminosäuren, die keine Homologie zu anderen Amylasen zeigt (Schneider et al., 1992; Svensson, 1994). Auch in anderen Amylasen gibt es Erweiterungen, allerdings sind diese nicht am N-Terminus des Proteins und auch nicht über eine Disulfidbrücke mit der Amylase-Domäne verknüpft. Von Aminosäu-

re 69 bis 174 des reifen Proteins besteht eine große Homologie (Abbildung 5-1) zu einer Domäne des cytoplasmatischen Chaperons GroEL (Spiess et al., 1997). Dies ist sehr ungewöhnlich und wurde bislang bei keiner anderen Amylase gefunden.

GroEL - 230	RDMLSVLEAVAKSGRPLLIVAEDVEGEALATLVVN--NMRGIVKVCVAVKAPGFGD	
MaLS - 69	RDGEYTLQIDTRSGIPTLMLSIQNAEFPVASLVRECPKWDGLPLITVDVSA-TFPE	
	** *++ +** * *++ + * +* ** + *+ * * * +	
GroEL -	---RRKAMLQDIAILLINGQVISEEIGTSLETASLES LGTAKRIVVTKENTTI	331
MaLS -	GAAVRDYYSQQIATVKNQIMLQPAATSNGLLLLERAETDTSAPFDWHNATV	174
	* *+***+ ***++ + + ** + ** + * + * *+	

Abb. 5-1. Vergleich der Aminosäuresequenz des N-Terminus von MaLS und einer Domäne von GroEL.

Der Aminosäurevergleich zwischen der N-terminalen Domäne von MaLS (Aminosäure 69 - 174) und der apikalen Domäne von GroEL (Aminosäure 230 - 331) erfolgte mit dem Programm Clustal W v6.1.

*: identische Aminosäure

+: konservativ ausgetauschte Aminosäure

Die Homologie beschränkt sich auf die apikale Domäne von GroEL. Auf der Basis von Mutationsexperimenten wird angenommen, daß diese Domäne an der Peptidbindung beteiligt sein könnte (Fenton et al., 1994). Aminosäuren, die sich dabei in GroEL für die Peptidbindung notwendig erwiesen (Tabelle 5-1), sind in MaLS hoch konserviert oder zumindest konservativ ausgetauscht.

Tab. 5-1. Einfluß einzelner Aminosäureaustausche in GroEL auf die Funktion.

Die Tabelle faßt die Daten von Fenton et al. (Fenton et al., 1994) zusammen.

Aminosäureaustausch	ATPase-Funktion	GroES-Bindung	Peptidbindung	Faltung
L237E	+	-	-	
E238A	+	-/+	+	Agg
L259S	+	-	-	
V263S	+	-	-	
V264S	v	-	-	
K277E	v	+	+	+
F281D	v	+	+	Agg
D283	+	+	+	+
K286E	+	+	+	+
A293E	+	+	+	+
L309K	+	b	+	+
L314K	+	b	+	+

+: kein Funktionsverlust

-: Funktionsverlust

v: reduzierte Funktion

b: verbesserte Funktion

Agg: Aggregation des Zielproteins

Durch die Disulfidbrücke zwischen Cystein-104 und Cystein-520 in MalS wird dieser Bereich an die C-terminale Amylasedomäne geführt. Durch die Reduktion der Disulfidbrücken in MalS werden die N-terminale Erweiterung und die Amylasedomäne getrennt. Dies führt zur Aggregation des Proteins, weil hydrophobe Bereiche exponiert werden. Man kann daher annehmen, daß die N-terminale Erweiterung von MalS eine Domäne bildet, die an der Faltung des Amylasekörpers beteiligt ist und als intramolekulares Chaperon hydrophobe Bereiche schützt.

Basierend auf den bisher beschriebenen Daten der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, der Kartierung der Disulfidbrücken, der Sequenzhomologie des N-Terminus und der Molekulargewichtsbestimmung durch die analytische Ultrazentrifugation wurde ein topologisches Modell von MalS erstellt (Abbildung 5-2). MalS besteht aus zwei Domänen: einer N-terminalen Region, die Homologie zur apikalen Domäne von GroEL aufweist und der C-terminalen Amylasedomäne. Der Amylasekörper ist im Modell als Faß dargestellt. Eine Seite des Zylinders wurde aufgrund der elektronenmikroskopischen Strukturdaten offen gelassen. Die N-terminale Erweiterung ist über eine Disulfidbrücke an die Amylasedomäne gebunden und schirmt hydrophobe Elemente ab.

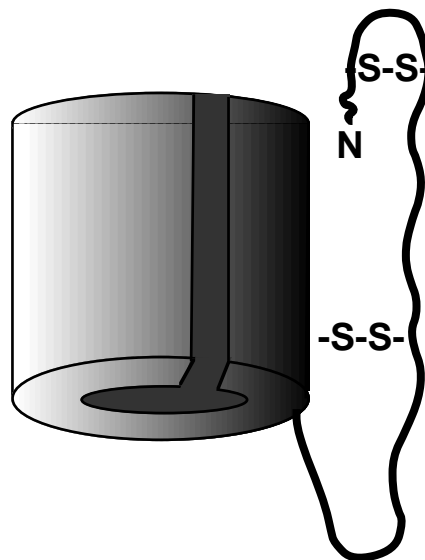


Abb. 5-2. Topologisches Modell von MalS.

Die Amylasedomäne von MalS ist als ein Zylinder dargestellt. Die N-terminale Erweiterung ist durch eine Disulfidbrücke zwischen Cystein-104 und Cystein-520 mit dem Amylasekörper verbunden.

Nur Cystein-520 ist ein auch in anderen Amylasen konserviertes Cystein und wird z. B. in den Amylasen von *Alteromonas haloplanctis* (Feller et al., 1992), *Aspergillus shirousamii* (Shibuya et al., 1992), *Schwanniomyces occidentalis* (Strasser et al., 1989) und *Saccharomyces fibuligera* (Itoh et al., 1987) gefunden. Weitere in Amylasen konservierte Cysteine kommen in MalS nicht vor, und die drei N-terminal lokalisierten Cysteine können nur in MalS beobachtet werden.

Natürlich vorkommende (Wendland et al., 1991) (Vanhove et al., 1997) oder künstlich eingeführte (Matsumura et al., 1991) Disulfidbrücken erhöhen die Stabilität vieler Proteine. Die enzymatische Aktivität einer β -Amylase aus *Bacillus polymyxa* ist stark abhängig von der

Bildung einer Disulfidbrücke, obwohl keines der Cysteine am Reaktionsmechanismus beteiligt ist (Uozumi et al., 1991). Die enzymatische Aktivität von MalS war nicht abhängig von den Disulfidbrücken. Eine Reduktion führte nicht zu einem Verlust, sondern zu einem leichten Anstieg der enzymatischen Aktivität. Dies ist durch eine verbesserte Zugänglichkeit des Substrats erklärbar. Die Disulfidbrücken konnten auch nicht die thermische Stabilität oder Resistenz gegenüber SDS von gereinigtem MalS unterstützen, wie dies für andere Proteine beobachtet worden war. Die Disulfidbrücken sind folglich nicht für die Stabilität oder enzymatische Aktivität von nativem MalS notwendig.

Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist jedoch unabdingbar für die Faltung von MalS. Ohne Disulfidbrücken kann MalS nicht in eine enzymatisch aktive Konformation falten. Dies konnte bei der Faltung *in vivo* und *in vitro* gezeigt werden. Um die Bedeutung der Ausbildung von Disulfidbrücken für die Faltung von MalS *in vivo* zu untersuchen, gibt es zwei verschiedene Ansätze: Expression von *malS* i) im Periplasma in einer *dsbA*⁻-Mutante oder ii) im reduzierenden Milieu des Cytoplasmas.

Die Ausbildung der Disulfidbrücken in periplasmatischen Proteinen wird durch die Disulfidbrücken-Oxidoreduktase DsbA katalysiert. Wurde eine *dsbA*⁻-Mutante, die *malS* von einem Plasmid exprimiert, bei 37 °C inkubiert, konnten nur 6 % der MalS-Aktivität des entsprechenden *dsbA*⁺-Stammes gemessen werden, und die Menge an oxidiertem MalS war reduziert. Die Pulse-Chase-Experimente zeigten, daß die Translokation und die Faltung von MalS im *dsbA*⁺-Hintergrund innerhalb von Sekunden abgeschlossen ist. In einem *dsbA*⁻-Stamm fand die Translokation ebenfalls statt, jedoch konnte nur reduziertes MalS nachgewiesen werden. Die reduzierte Form von MalS war instabil und wurde innerhalb von Minuten abgebaut. Im Cytoplasma ist bei einem Wachstum der Zellen bei 37 °C keine Ausbildung von Disulfidbrücken zu beobachten, und das Protein ist nicht funktionell. Auch eine Veränderung des Cytoplasmas zu stark oxidierenden Bedingungen konnte keine Faltung stimulieren. Die unterbliebene Faltung im Cytoplasma beruht nicht auf dem Fehlen der Signalsequenz im Protein, da signalsequenzloses MalS durch einen veränderten Translokationsapparat (z. B. *prlA4*-Mutanten) in das Periplasma transportiert wird und dort korrekt faltet (Prinz et al., 1996).

Bei einer Inkubationstemperatur der Stämme von 28 °C ist die Faltung wesentlich effizienter, und nach der Expression von *malS* in einem *dsbA*⁻-Stamm falten ca. 50 % des Proteins. Die Disulfidbrücken in MalS werden gebildet, und das Protein ist enzymatisch aktiv. Die Pulse-Chase-Experimente haben aufgezeigt, daß die Faltung nicht vergleichbar schnell stattfindet wie in dem *dsbA*⁺-Hintergrund, sondern daß es zu einer Akkumulation von oxidiertem MalS kommt, da reduziertes MalS langsamer abgebaut wird. Ein weiterer Grund für die verbesserte Oxidation könnte eine im Vergleich zu 37 °C erhöhte Sauerstoffmenge im Medium sein, die eine spontane Disulfidbrückenbildung begünstigt.

Im Cytoplasma findet bei 37 °C keine Disulfidbrückenbildung in MalS statt. Das Protein ist enzymatisch inaktiv. Auch bei 28 °C ist die Oxidation wesentlich ineffektiver als im Periplasma. Erst unter den stark oxidierenden Bedingungen des Stammes FA113 (*trxB::kan...Tn10 gor522...Tn10*) kommt es zur Ausbildung von Disulfidbrücken in MalS. Allerdings ist das oxidierte MalS nicht enzymatisch aktiv; die Bildung der Disulfidbrücken

führt nicht zwangsläufig zu einem korrekt gefalteten Protein – ein weiterer wichtiger Faltungsschritt oder Faltungshelfer ist notwendig, der nicht im Cytoplasma stattfinden kann bzw. existiert. Dies unterscheidet MalS von der alkalischen Phosphatase. Auch dieses Enzym benötigt Disulfidbrücken für seine enzymatische Aktivität (Derman und Beckwith, 1991), jedoch ist eine aktive Expression im Cytoplasma bereits in *trxB*- oder *gsh*-Mutanten möglich (Derman et al., 1993).

Obwohl MalS vier Cysteine enthält, die zwei Disulfidbrücken bilden, scheint es in Anwesenheit von DsbA nicht zu einer inkorrekten Auswahl der Cysteine für die Disulfidbrücken zu kommen. Eine Deletion der Disulfidbrücken-Isomerase DsbC hatte keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität oder Faltung von MalS *in vivo*. Die Wahl der Cysteine für die Disulfidbrücken könnte durch die kurze Abfolge in der Primärstruktur der Cysteine-40 und -58 bestimmt werden. Sie liegen nur 18 Aminosäuren voneinander entfernt. Möglicherweise bildet sich so diese Disulfidbrücke zuerst aus, wodurch die Ausbildung der zweiten Disulfidbrücke und damit eine Anheftung der N-terminalen Erweiterung an die Amylasedomäne erzielt wird.

Auch für die Faltung von MalS *in vitro* ist die Bildung der Disulfidbrücken eine Voraussetzung. Unter reduzierenden Bedingungen ist keine Faltung von MalS möglich. Eine spontane Faltung ist möglich, ist aber nicht sehr effizient, da nur ungefähr 20 % des Proteins Disulfidbrücken ausbilden und enzymatisch aktiv sind. Die Oxidation der Cysteine scheint durch den im Puffer gelösten Sauerstoff katalysiert zu werden.

Das Redoxpotential hat deshalb einen erheblichen Einfluß auf die Faltungseffizienz. Als optimal erwies sich ein Redoxpotential, bei dem fünfmal mehr reduziertes Glutathion vorliegt als oxidiertes. Dies erscheint zunächst paradox, da man die Thiole im Protein oxidieren möchte. Wahrscheinlich verlangsamt aber der Einsatz von mehr reduziertem als oxidiertem Glutathion die Faltung, wodurch diese flexibler ist und so zu einem präziseren Endergebnis führt. Falsch gebildete oder zu früh gebildete Disulfidbrücken können durch das reduzierte Glutathion wieder reduziert werden. Das dadurch gebildete oxidierte Glutathion kann wieder die Ausbildung einer Disulfidbrücke katalysieren. Korrekt ausgebildete Disulfidbrücken könnten durch die fortschreitende Faltung fixiert werden.

Durch DsbA konnte *in vitro* die Ausbeute an oxidiertem MalS nicht erhöht werden. Die Katalyse der Disulfidbrückenbildung durch Glutathion scheint sehr effektiv zu sein. Möglich ist ein kinetischer Effekt von DsbA. Dies konnte aber nicht festgestellt und untersucht werden, da die hierfür notwendigen technischen Mittel nicht zur Verfügung standen.

Die Oxidation von MalS konnte nur bei alkalischem pH-Wert durch Glutathion katalysiert werden. Bei neutralem oder saurem pH-Wert war, selbst in der Gegenwart von Glutathion oder DsbA, keine Ausbildung der Disulfidbrücken zu beobachten. Dies ist ungewöhnlich, denn es ist bekannt, daß Glutathion und DsbA selbst bei saurem pH-Wert katalytisch aktiv sind (Ruddock et al., 1996) (Wunderlich et al., 1993). Ein zweiter pH-abhängiger Faltungsschritt muß existieren, ohne den die Ausbildung der Disulfidbrücken nicht möglich ist.

Die Disulfidbrücken in MalS geben dem nativen Protein keinen Stabilitätsgewinn. Die Ausbildung der Disulfidbrücken ist eine Grundvoraussetzung für die erfolgreiche Faltung von

Mals. Wahrscheinlich ist es ihre Aufgabe, während der Faltung den N-Terminus als intramolekulares Chaperon an die C-terminale Amylasedomäne heranzuführen, um so eine Faltung einzuleiten.

5.3 Die Protease DegP ist auch ein Chaperon

Durch testen verschiedener proteasedefizienter Stämme konnte das für den Abbau von falsch gefaltetem reduziertem MalS verantwortliche Enzym identifiziert werden: es ist die Protease DegP. Die zu DegP paralogen Proteasen DegQ und DegS haben beim Abbau von falsch gefaltetem MalS *in vivo* nur eine untergeordnete Rolle. Nullmutationen in diesen Proteasen konnten MalS ohne Disulfidbrücken im Periplasma nicht stabilisieren. Dieses Ergebnis bestätigt die Hypothese von Waller und Sauer (Waller und Sauer, 1996), daß zwar eine ähnliche Funktions- und Substratspezifität bei DegP und DegQ bestehen, jedoch in der Zelle, trotz des gemeinsamen Kompartiments, eine unterschiedliche Anwendung stattfindet.

Nach dem Ausschalten von DegP in einem *dsbA*-Stamm ist aber nicht nur der Abbau von MalS, sondern auch dessen Faltung unterbunden. In einer *dsbA-degP*-Doppelmutante wird die reduzierte Form von MalS zwar stabilisiert, aber es kann kein oxidiertes MalS mehr nachgewiesen werden. Das vorliegende MalS ist enzymatisch inaktiv. In einer *dsbA*-Einzelmutante war bei einer Inkubationstemperatur von 28 °C noch eine Aktivität von 58 % meßbar, und der Anteil an oxidiertem MalS korrelierte mit der enzymatischen Aktivität. Die Faltung von MalS ist in einer *dsbA*-Mutante von DegP abhängig. In einem *dsbA*⁺-Hintergrund war in einer *degP*-Nullmutante kein Effekt auf die Faltung nachweisbar. MalS bildete Disulfidbrücken aus, und die enzymatische Aktivität entsprach der eines *degP*⁺-Stammes. Die Faltung von MalS ist daher nur unter Bedingungen, bei denen es nicht korrekt falten kann, von DegP abhängig. DegP ist also nicht nur für den Abbau von falsch gefaltetem MalS verantwortlich, sondern vermittelt auch unter Streßbedingungen die Faltung von MalS.

Um eine mögliche Chaperonaktivität von DegP *in vivo* zu testen, wurden *mals* und eine proteolytisch inaktive Punktmutante von *degP*, *degP*_{S210A}, koexprimiert. Diese Punktmutante hat einen Aminosäureaustausch von Serin zu Alanin im aktiven Zentrum. Ein Effekt dieses Proteins auf die Faltung kann dadurch nicht auf der Proteaseaktivität beruhen. Nach der Koexpression von *mals* und *degP*_{S210A} in einem *dsbA-degP*-Stamm ist wieder eine Amylaseaktivität meßbar, und MalS liegt zumindest teilweise in oxidiertem Form vor. Zur weiteren Charakterisierung des Einflusses von DegP auf die Faltung von MalS wurden kalte osmotische Schocks von verschiedenen Stämmen hergestellt. In einer *dsbA-degP*-Mutante war nur reduziertes MalS nachweisbar, und das Protein lag komplett in der unlöslichen Fraktion vor. Eine Faltung konnte nicht stattfinden, weshalb MalS aggregierte. Nach der Expression von *degP*_{S210A} in diesem Stammhintergrund konnten zwei unterschiedliche Fraktionen beobachtet werden: i) reduziertes MalS in der unlöslichen Fraktion und ii) oxidiertes MalS in der löslichen Fraktion. Nur oxidiertes MalS war enzymatisch aktiv. Eine Katalyse der Disulfidbrückenausbildung durch DegP ist auszuschließen, da DsbA nur eine geringe Homologie zu DegP aufweist (15 % identisch über die gesamte Länge von DsbA, Daten nicht gezeigt) und das für eine Katalyse notwendige C-X-X-C Motiv fehlt (Daten nicht gezeigt). Dieses

Motiv (Freedman et al., 1994) findet man bei allen an der Ausbildung oder Reduktion von Disulfidbrücken beteiligten Proteinen. Die Aufgabe von DegP bei der Faltung von MalS scheint darin zu liegen, eine Aggregation des reduzierten MalS zu verhindern und dadurch eine langsame spontane Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS zu ermöglichen. Eine Aggregation von MalS würde eine anschließende Ausbildung der Disulfidbrücken und damit auch die weitere Faltung verhindern. DegP vermittelt *in vivo* nicht nur den Abbau von falsch gefaltetem MalS, sondern auch die Faltung von MalS unter Streßbedingungen.

Diese Ergebnisse werden durch die β -Galaktosidase-Aktivität einer chromosomalen *degP-lacZ*-Fusion bekräftigt. Die Expression von *mals* in einem *dsbA*- oder *dsbA-degP*-Hintergrund erhöhte die β -Galaktosidase-Aktivität. Für die Faltung und den Abbau von MalS wird unter diesen Bedingungen DegP benötigt. Die Promotoraktivität ist stark erhöht, um das Expressionsniveau an die auftretende Menge von falsch gefaltetem MalS anzupassen. Die Expression von *degP*_{S210A} unterstützt die Faltung von MalS. Es liegt weniger falsch gefaltetes Protein im Periplasma vor, und so ist in einem *dsbA*- oder *dsbA-degP*-Stammhintergrund die Expression von *degP* stark reduziert.

In einem *degP*⁻-Stamm kann im Vergleich zum *degP*⁺-Stamm keine signifikante Veränderung festgestellt werden. DegP hat unter den Bedingungen einer korrekten Faltung von MalS keine Bedeutung und wird nicht benötigt. Eine Expressionssteigerung ist deshalb nicht notwendig. Eine Nullmutation im *degP*-Gen ist für die Zellen auch erst bei Temperaturen oberhalb 37 °C letal. Bei 28 °C, den Anzuchtbedingungen für die Bestimmung der *degP-lacZ*-Aktivität, ist die Bedeutung der Funktion von DegP für die Zelle geringer, da weniger falsch gefaltetes Protein vorliegt. Auch unter Bedingungen erhöhter Osmolarität oder eines niedrigen pH-Wertes konnte keine Induktion beobachtet werden. Dies kann zwei Ursachen haben: i) unter diesen Bedingungen tritt ein Faltungsstreß für die Zelle auf, der nicht durch DegP eliminiert werden kann, wodurch eine Induktion der Expression unterbleibt, oder ii) die Proteinfaltung ist von diesen externen Faktoren abgeschirmt und kann nicht beeinträchtigt werden.

Die selben Effekte können in den einzelnen Stämmen auch ohne Expression von *mals* beobachtet werden; lediglich die absolute Induktion der *degP*-Expression war geringer. Die Expressionssteigerung von *degP* in Nullmutanten von Faltungshelfern, wie z. B. DsbA oder SurA ist bekannt (Pogliano et al., 1997). DegP wird erst von der Zelle benötigt, wenn falsch gefaltete Proteine vorliegen. Die Daten zeigen aber, daß die Zelle auch auf das Auftreten eines einzelnen falsch gefalteten Proteins reagiert und die Expression von *degP* an die Menge des falsch gefalteten Proteins anpaßt.

Die Steuerung der Expression von *degP* wird über zwei Signaltransduktionswege vermittelt: den RseA/B-Weg und das CpxA/R-Zweikomponentensystem. Eine Verminderung des Faltungsstress für die Zelle durch DegP_{S210A} reduziert auch in einer konstitutiven CpxA-Mutante die *degP-lacZ*-Aktivität. Der Faltungsstreß, den DegP_{S210A} vermindert, wird über beide Signaltransduktionswege registriert. Durch den RseA/B-Weg und das CpxA/R-Zweikomponentensystem werden folglich nicht vollkommen unterschiedliche Signale wahrgenommen, sondern die beiden Wege sind miteinander verzahnt.

Die Reduktion der β -Galaktosidase-Aktivität nach der Expression von *degP*_{S210A} kann nicht auf einer Regulation der *degP*-Expression durch DegP_{S210A} beruhen, da die *degP*-Expression nicht autoreguliert ist (Strauch und Beckwith, 1988).

Ein direkter Effekt von DegP bzw. DegP_{S210A} auf die Faltung von MalS konnte durch die *in vitro* Experimente gezeigt werden. DegP und DegP_{S210A} unterstützen die Ausbildung von Disulfidbrücken und damit die Faltung von MalS *in vitro* bei 28 °C. Auf einem SDS-Gel war, nach einer Faltung von MalS in der Gegenwart von DegP oder DegP_{S210A}, ein erhöhter Status an oxidiertem MalS zu beobachten. Diese Unterstützung der Faltung war jedoch nicht bei den Kontrollproteinen BSA oder Lysozym nachweisbar. Eine Faltung von MalS kann nicht in der Gegenwart von DTT durch DegP vermittelt werden. Die Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS wird auch in der Gegenwart von DegP unterbunden und ist ebenfalls wie bei einer spontanen Faltung eine Voraussetzung. Dies unterstützt die aus den *in vivo* Experimenten abgeleitete Hypothese, daß DegP lediglich eine Aggregation des reduzierten MalS verhindert und nicht aktiv an der Bildung der Disulfidbrücke beteiligt ist.

Bei höheren Faltungstemperaturen (37 °C und 42 °C) wird die Ausbildung der Disulfidbrücken durch DegP_{S210A} vergleichbar unterstützt wie bei 28 °C. Die enzymatische Aktivität von MalS ist jedoch stark reduziert im Vergleich zur Faltung bei 28 °C. In der Gegenwart von DegP wird bei einer höheren Faltungstemperatur ein Abbau von reduziertem MalS beobachtet (37 °C). Bei 42 °C ist die gesamte Proteinmenge stark reduziert, und nur eine geringe Menge an oxidiertem MalS konnte beobachtet werden. Die Bifunktionalität von DegP scheint daher über die Temperatur gesteuert zu werden (Erörterung des Mechanismus in Kapitel 5.6).

Die Effizienz der Faltung ist durch die Titrationsexperimente untersucht worden. Nach der Faltung von MalS bei 28 °C, 37 °C oder 42 °C in Gegenwart unterschiedlicher DegP_{S210A}-Konzentrationen wurde die enzymatische Aktivität von MalS bestimmt. Bei einer Faltungstemperatur von 37 °C oder 42 °C ist die Ausbeute an enzymatisch aktivem MalS wesentlich geringer als bei 28 °C, obwohl das Verhältnis von oxidiertem zu reduziertem MalS bei allen Temperaturen nahezu identisch ist. Nur ein Drittel der enzymatischen Aktivität im Vergleich zu einer Faltung bei 28 °C waren nachweisbar. Eine Faltung von MalS bei höheren Temperaturen ist, ebenso wie bei der Faltung *in vivo*, wesentlich ineffektiver.

Diese Titrationsexperimente haben gezeigt, daß bei allen drei getesteten Temperaturen eine Unterstützung der Faltung von MalS erst bei DegP_{S210A}-Konzentrationen erfolgt, die ungefähr äquimolar zu der eingesetzten MalS-Menge sind. Dies bedeutet nicht zwangsläufig, daß die Chaperonaktivität *in vivo* ebenfalls stöchiometrisch ist. Dafür gibt es mehrere Gründe: i) zum einen ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt der Faltung nicht bekannt, und viele Zyklen von Bindung und Freisetzung können für eine effektive Faltung von MalS notwendig sein. ii) Außerdem kann es bei der Proteinfaltung auch zu Intermediaten kommen, die nicht mehr gefaltet werden können und die Maschinerie blockieren. Diese Moleküle könnten *in vivo* oder bei Wildtyp DegP durch die proteolytische Aktivität eliminiert werden. Dies würde auch erklären, warum keine quantitative Oxidation von MalS zu beobachten ist. Bei dem reduzierten MalS könnte es sich um solche Intermediate handeln. iii) Schließlich könnte die Freisetzung des gefalteten MalS von DegP *in vitro* sehr ineffizient sein. Für andere molekulare Chaperone sind Faktoren, z. B. GrpE oder ATP bekannt, die eine Freisetzung des Substrats erleichtern. Im Periplasma existiert kein ATP (Rosen, 1987), und auch über das

Vorkommen von anderen regulatorischen Faktoren ist nichts bekannt. Eine Freisetzung des Substrats von DegP könnte *in vivo* erheblich effektiver sein. Diese drei Punkte können *in vitro* die Effizienz der Faltung verfälschen. Mit den bisherigen Daten ist deshalb über die Molaritätsverhältnisse keine Aussage möglich.

DegP ist kein spezifisches Chaperon für MalS, es ist ein allgemeines molekulares Chaperon und kann die Faltung der verschiedensten Proteine vermitteln. Der Schluß, daß DegP ein generelles Chaperon ist, kann aus der Komplementation des hitzesensitiven Phänotyps von *degP*-Nullmutanten durch DegP_{S210A} und der Unterstützung der Faltung der Citrat Synthase und der β -Galaktosidase *in vitro* geschlossen werden.

degP-Nullmutanten sind hitzesensitiv. Temperaturen oberhalb 37 °C führen zu einer Lyse der Zellen. Durch einen Hitzestreß kommt es in der Zelle zur Entfaltung von nativen Proteinen und der Falschfaltung von Proteinen. Entfaltete Proteine würden aggregieren; dies wäre letal für die Zelle. Die Zelle hat zwei Antwortmöglichkeiten: den Abbau von entfalteten Proteinen und Aggregaten durch die Proteasen und/oder ein Verhindern und Auflösen der Proteinaggregation durch die Chaperone. Eine Expression von *degP*_{S210A} in diesen Mutanten kann die Temperatursensitivität wieder aufheben. Dieser Effekt kann nicht auf der Proteasefunktion von DegP beruhen, weil die Punktmutante proteolytisch inaktiv ist. Die Zellen könnten durch die Chaperonaktivität von DegP_{S210A} „gerettet“ werden. Auch bei der Protease Lon ist beobachtet worden, daß der Phänotyp einer *lon*-Nullmutante durch ein Lon-Derivat mit einem Serin zu Alanin-Austausch im aktiven Zentrum komplementiert werden kann (Roudiak et al., 1998) (van Melderen und Gottesman, 1999), und es wird eine Chaperonaktivität diskutiert. Für die Komplementation wird eine ungefähr vierfach höhere DegP_{S210A}-Menge als DegP-Menge benötigt. Dies ist ein Hinweis darauf, daß der Proteasefunktion eine größere Bedeutung bei der Komplementation zukommt als der Chaperonaktivität. Die Proteasefunktion verhindert auch, daß irreversibel entfaltete Proteine durch ein ständiges Binden an DegP oder an mögliche periplasmatische Chaperone und Faltungskatalysatoren bzw. jedes andere funktionelle Protein diese austitrieren bzw. blockieren und dadurch wichtige biologische Funktionen unterbinden. Die Bifunktionalität von DegP erlaubt der Zelle eine schnelle und präzise Entscheidung über das Schicksal falsch gefalteter Proteine: Abbau oder Rückfaltung!

Die Rückfaltung von chemisch denaturierter Citrat Synthase konnte in der Gegenwart von DegP oder DegP_{S210A} stimuliert werden; die spontane Rückfaltung von 5 % konnte auf ungefähr 20 % gesteigert werden. Die Effizienz der Rückfaltung entspricht der für GroEL/ES in der Literatur beschriebenen (Buchner et al., 1998). Die absolute Ausbeute ist für GroEL/ES höher (75 %), allerdings betrug die spontane Rückfaltung hier 25 %. Bei DegP konnte also eine vierfache, für GroEL/ES eine dreifache Stimulation der Faltung bestimmt werden. Aufgrund dieses Vergleichs kann von einer hohen Effizienz der Chaperonaktivität von DegP ausgegangen werden.

Auch die Rückfaltung von chemisch denaturierter β -Galaktosidase konnte durch DegP_{S210A} stimuliert werden. Die Ausbeute an korrekt zurückgefalteter β -Galaktosidase war zwar gering (0,4 %), jedoch betrug die spontane Rückfaltung lediglich 0,009 %, so daß die Rückfaltung um das 44fache gesteigert werden konnte. Die β -Galaktosidase ist durch Guanidiniumhydrochlorid denaturiert worden. Dies führt zu einer Aggregation des denaturierten

Proteins (Nichtl et al., 1998). Die geringe Ausbeute der Rückfaltung könnte auf dem Vorliegen dieser Aggregate liegen, da es wesentlich komplizierter ist, bereits gebildete Aggregate aufzulösen als Proteine vor der Aggregation zu schützen und erfolgreich zurückzufalten. Eine weitere Erklärung der geringen Ausbeute wäre, daß DegP_{S210A} nur die Faltung der Monomere der β -Galaktosidase aber nicht die weitere Assemblierung dieser unterstützen kann. Durch die Tetramerisierung wird das Molekül zu groß, um von DegP geschützt zu werden.

Für Proteasen, die auch eine intrinsische Chaperonaktivität aufweisen wurde der Name Charonin geprägt (Gottesman et al., 1997). Bislang sind drei Familien bekannt. i) In der Clp-Familie ist die Proteaseaktivität auf die ClpP- und die Chaperonaktivität auf die ClpA- und ClpX-Untereinheiten (Wawrzynow et al., 1995) verteilt. Die Substrate werden zunächst von ClpA/ClpX gebunden und ATP-abhängig moduliert. Anschließend erfolgt der Abbau durch ClpP. In der Abwesenheit der Proteaseuntereinheit kann das Substrat in einer rückgefalteten aktiven Konformation freigesetzt werden. ii) Bei der FtsH-Familie sind beide Aktivitäten in einer Polypeptidkette vereint. Mutanten im aktiven Zentrum können weiterhin die Faltung der ATP-Synthase *in vivo* vermitteln, verlieren jedoch ihre proteolytische Funktion (Schumann, 1999). iii) Auch bei der Lon-Familie können solche Mutanten des aktiven Zentrums nach der Überproduktion noch die Faltung von Proteinen vermitteln (van Melderen und Gottesman, 1999). Aufgrund der experimentellen Befunde der vorliegenden Arbeit kann DegP auch als ein Charonin klassifiziert werden.

Die Chaperonaktivität von Proteasen ist häufig wichtig für die Proteolyse, da die Peptidbindedomäne mit dem Substrat interagiert und ein chaperonähnliches Modellieren oder Rückfalten der Proteine vermittelt. Dies ist z. B. für Lon eine Grundvoraussetzung für eine effiziente proteolytische Spaltung. Auch das Zusammenspiel von Proteasen und Chaperonen hat diesen Effekt. So kooperiert ClpX mit Hsp40 oder Hsp70 (Glover und Lindquist, 1998) und die mitochondrialen Proteasen PIM1 und AAA mit dem mitochondrialem Hsp70-System (Savel'ev et al., 1998). Die Interaktion von einem Chaperon und einer Protease oder die Zusammenfassung beider Aktivitäten in einem Molekül stellt ein effizientes System der Qualitätskontrolle für neu gefaltete Proteine dar und ermöglicht einen unmittelbaren Abbau falsch gefalteter Proteine.

Es handelt sich bei allen bislang bekannten Charoninen um ATP-abhängige Proteasen; DegP ist das erste ATP-unabhängige Charonin. Die Hydrolyse von ATP dient bei den Chaperonen und Proteasen zu einer Herabsetzung der Bindungsaffinität zum Substrat und damit seiner Freisetzung. Die Energie für die eigentliche Faltung bzw. die Proteolyse wird nicht durch die ATP-Hydrolyse gestellt. Für DegP muß ein anderer Mechanismus der Freisetzung gelten. Die Bindung des Substrats könnte solange erfolgen, bis es gefaltet ist und aufgrund einer kompakten hydrophilen Struktur freigesetzt wird. Kann eine Faltung nicht erfolgen, setzt auch bei geringen Temperaturen eine langsame Proteolyse ein, bis die Fragmente so klein sind, daß sie nicht mehr gebunden werden (Waller und Sauer, 1996). Aber auch ein zusätzlicher periplasmatischer Faktor ist denkbar, der durch eine Bindung an DegP eine Konformationsänderung initiiert. Die hohe Effizienz der Rückfaltung von der Citrat Synthase durch DegP im *in vitro* System zeigt, daß eine Freisetzung auch ohne einen Kofaktor stattfinden kann. Eine stabile Bindung ohne Freisetzung zwischen dem Chaperon und dem Substrat

unterdrückt eine enzymatische Aktivität. Dies wurde bereits mit Citrat Synthase und den Chaperonen Hsp33 (Jacob et al., 1999) und GroEL (Buchner et al., 1998) beobachtet.

Der Mechanismus der Substratfreisetzung klärt auch die Frage der Entscheidungskriterien über Faltung versus Abbau. Deshalb sollte die Aufklärung dieser Punkte ein Hauptziel zukünftiger Experimente sein.

Die Protease DegP ist ein bifunktionelles Protein. Neben der proteolytischen Aktivität besitzt DegP noch die Fähigkeit als Chaperon zu agieren. Dadurch ist eine Unterstützung anderer Proteine in Situationen erschwerter Faltung möglich. Die Bifunktionalität erlaubt eine schnelle und präzise Entscheidung über das Schicksal entfalteter Proteine: Faltung oder Abbau!

5.4 Vergleich der Faltung von MalS *in vivo* und *in vitro* und Modell des Faltungsablaufs

Die Untersuchung der Faltung von MalS *in vitro* hat gezeigt, daß ebenso wie bei der *in vivo* Faltung eine Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS eine Grundvoraussetzung der Faltung ist. Die Knüpfung der Disulfidbrücken nimmt eine zentrale Stelle zu Beginn der Faltung ein.

Eine effiziente Faltung *in vitro* ist abhängig von der Temperatur. Bei höheren oder niedrigeren Temperaturen ist die Faltung sehr ineffizient. Es bilden sich keine Disulfidbrücken aus, und MalS faltet nicht in eine enzymatisch aktive Konformation. Es lassen sich Parallelen zu der Faltung von MalS in einer *dsbA*-Nullmutante ziehen. Auch hier ist die Faltung temperaturabhängig.

MalS kann *in vitro* nur bei einem pH-Wert falten, bei dem es eine hohe enzymatische Aktivität besitzt. Bei niedrigeren pH-Werten unterbleibt die Ausbildung der Disulfidbrücken. Auch durch Glutathion oder DsbA kann unter solchen Bedingungen keine Oxidation stattfinden. Dies könnte ein Kontrollmechanismus sein, um MalS, das nicht voll enzymatisch aktiv sein wird, *in vivo* einem Abbau zuzuführen. Ein Abbau von gefalteten Proteinen findet in *E. coli* nur in seltenen Fällen statt, so daß bereits zu einem frühen Zeitpunkt über die Elimination entschieden werden muß.

In der Anwesenheit des Substrats PG-6 unterbleibt die Faltung *in vitro*. Dies ist überraschend, da im Periplasma während der Faltung das Substrat anwesend ist. *In vivo* wird möglicherweise das faltende MalS z. B. durch ein Chaperon vor seinem Substrat abgeschirmt. Die Fähigkeit der Substratbindung scheint aber schon vor dem Erreichen der aktiven Konformation zu bestehen. Es wäre sinnvoll zu ermitteln, ob eine Ausbildung der Disulfidbrücken stattfindet. Hiermit ließe sich feststellen, ob die Substratbindung die Faltung zu einem frühen oder späten Zeitpunkt verhindert. Durch die Verhinderung der Faltung kann das Substrat PG-6 als Agens für zukünftige Experimente ausgenutzt werden, um Faltungsintermediate zu identifizieren. Über solche „eingefrorene“ Faltungsschritte ließe sich eine detaillierte Analyse ausführen.

Ein Vergleich der Faltung von MalS *in vitro* und *in vivo* zeigt, daß viele Gemeinsamkeiten bestehen. Die Daten lassen sich miteinander verbinden und ergänzen, so daß ein vorläufiges Modell der Faltung von MalS entworfen werden kann (Abbildung 5-3).

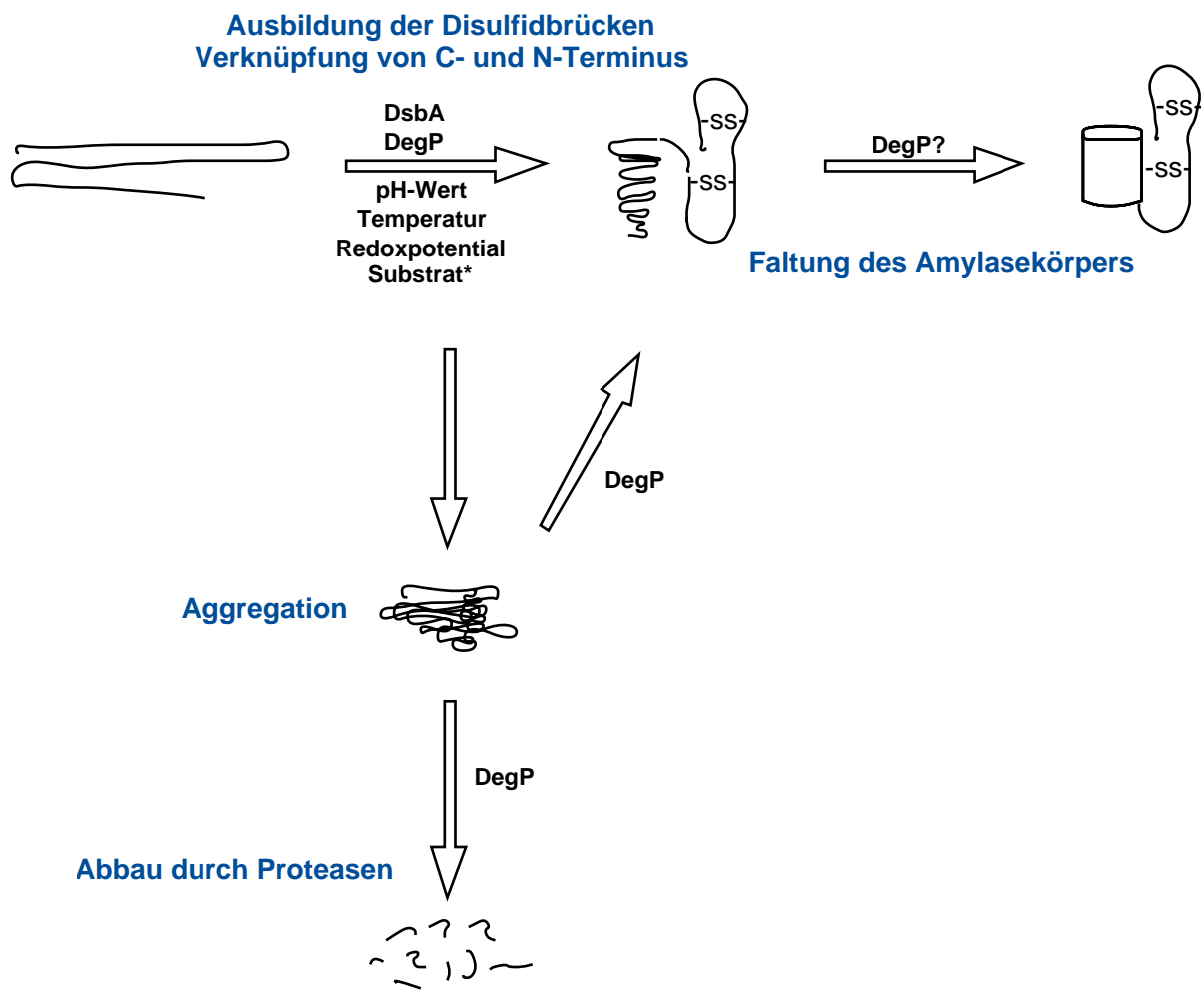


Abb. 5-3. Modell des Faltungsablaufs von MalS.

Das Modell des Faltungsablaufs basiert auf einer Verknüpfung der experimentellen Daten der Faltung von MalS *in vivo* und *in vitro*. Die Proteine, die oberhalb des Pfeiles stehen, unterstützen die Faltung; die Faktoren, die unterhalb des Pfeiles stehen, können positiv und negativ die Faltung beeinflussen (* Die Störung der Faltung in Gegenwart von dem Substrat konnte nur für die Faltung *in vitro* gezeigt werden). Die Amylasedomäne von MalS ist durch einen Zylinder dargestellt.

Ein kritischer Punkt bei der Faltung von MalS ist die Ausbildung der Disulfidbrücken in MalS. Biochemische Parameter, die einen Einfluß auf diesen Schritt haben, sind der pH-Wert, die Temperatur, das Redoxpotential und – zumindest *in vitro* – die Anwesenheit des Substrats. Die frühen Faltungsschritte werden durch die Proteine DsbA und DegP katalysiert bzw. unterstützt. Dieser erste Abschnitt erlaubt auch eine frühe Kontrolle über die weitere Faltung von MalS. Ist eine Disulfidbrückenausbildung nicht möglich, unterbleibt eine weitere Faltung, und das Protein aggregiert. Ein Abbau kann nun durch die Proteasen, z. B. DegP eingeleitet werden. Durch die Ausbildung der Disulfidbrücken wird der N-Terminus an die C-terminale Amylasedomäne herangeführt und vermittelt wahrscheinlich die Faltung des Amylasekörpers. Ob hierbei auch andere Proteine beteiligt sind, ist noch nicht geklärt.

Bei der Faltung von MalS *in vitro* und *in vivo* können viele Gemeinsamkeiten festgestellt werden. Es läßt sich so ein Modell des Faltungsablaufs aufstellen, bei dem die Faltung durch die Bildung der Disulfidbrücken eingeleitet wird. Anschließend folgt die Faltung des Amylasekörpers mit der Unterstützung der N-terminalen Domäne.

5.5 Struktur- und Funktionsanalyse von DegP

Zur Aufklärung der Funktion der einzelnen Domänen von DegP sind verschiedene Derivate von DegP und DegP_{S210A} konstruiert worden, denen eine oder beide PDZ-Domänen fehlen. Zusätzliche Information lieferten zwei zufällig erhaltene Punktmutanten und ein Konstrukt, das die PDZ-Domänen ohne die restlichen Domänen von DegP exprimiert. Nachdem die Punktmutante DegP_{V386A} sich wie DegP verhielt und die Hitzesensitivität einer *degP*-Nullmutation vollständig komplementieren konnte, wurde dieses Protein nicht gereinigt und weiter analysiert. Die Mutation befindet sich laut der Sekundärstrukturvorhersage in einem β -Strang der PDZ2-Domäne. Da es sich um einen konservativen Aminosäureaustausch handelt, scheint die Mutation keinen Einfluß auf die Struktur von DegP zu nehmen, und die Funktion bleibt vollständig erhalten. Alle weiteren konstruierten Derivate unterschieden sich von DegP, und ihr Oligomerisierungsgrad und die verbliebene Funktion (Protease- und Chaperonaktivität) sind untersucht worden. Die Daten sind in Tabelle 5-2 zusammengefaßt.

Die Deletion einer oder beider PDZ-Domänen von DegP reduzierte die proteolytische Aktivität drastisch. Dies konnte durch verschiedene Substrate bestätigt werden. Eine Quantifizierung der proteolytischen Aktivität erfolgte mit Resorufin-markiertem Casein als Substrat. Bei der Mutante DegP_{E196K} war die proteolytische Aktivität stark vermindert und oberhalb 32 °C noch weiter reduziert. Ein Abbau von gefaltetem reduziertem MalS wurde erst bei 42 °C beobachtet. Unterhalb dieser Temperatur war ein Abbau nicht sichtbar, allerdings entspricht die Sensitivität dieser Experimente nicht der von Resorufin-markiertem Casein als Substrat. Die Temperatursensitivität scheint demnach vom Substrat abzuhängen. Hieraus kann gefolgert werden, daß der Aminosäureaustausch, der in der katalytischen Domäne lokalisiert ist, vermutlich die Substratbindung verändert. Durch die Mutation wird das Protein thermolabil. Der Effekt einzelner Aminosäureaustausche ist häufig schwer zu interpretieren. Bei der Mutante DegP_{E196K} ist wahrscheinlich die Bindung der Substrate verschlechtert, aber auch eine Störung der Interaktion der Aminosäuren der katalytischen Triade kann nicht ausgeschlossen werden. Auf der negativen Thermosensitivität des DegP_{E196K} beruht vermutlich auch die Unfähigkeit, die Hitzesensitivität einer *degP*-Nullmutante zu komplementieren. Die proteolytische Funktion ist stark eingeschränkt und ist nicht mehr ausreichend für eine Komplementation.

Bei den Konstrukten ohne PDZ1- oder PDZ2-Domäne konnte mit Resorufin-markiertem Casein eine Restaktivität von 5 % gemessen werden. Im Gegensatz zu DegP Δ PDZ2 war DegP Δ PDZ1 temperatursensitiv, und so konnte oberhalb einer Temperatur von 37 °C keine proteolytische Aktivität mehr bestimmt werden. Diese Instabilität des Proteins erklärt auch den Unterschied, daß DegP Δ PDZ1 im Gegensatz zu DegP Δ PDZ2 den hitzesensitiven Phänotyp eines *degP*-Stammes nicht aufheben kann, obwohl die proteolytische Restaktivität und die Chaperonaktivität identisch sind. Der Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS und reduziertem gefaltetem MalS entspricht diesen Ergebnissen. Die proteolytische Aktivität war bei

beiden Konstrukten stark reduziert, und DegP $_{\Delta PDZ1}$ war bei Temperaturen > 37 °C nicht mehr proteolytisch aktiv. Nach der Deletion beider PDZ-Domänen war mit keinem der getesteten Substrate eine Proteolyse feststellbar. Für eine proteolytische Aktivität von DegP sind also die PDZ-Domänen unerlässlich.

Tab. 5-2. Eigenschaften von DegP und den DegP-Derivaten.

Protein	Komple- mentation ^a	Δ ssMalS ^b	Spaltung von red. MalS ^c	Casein ^d	Chaperon- aktivität ^e	oligomere Form ^f
DegP	+++	+++	+++	+++	+++	12, 6, 3*
DegP $_{\Delta PDZ1}$	-	+	-	+ [#]	+++	3
DegP $_{\Delta PDZ2}$	+	++	++	+	+++	1
DegP $_{\Delta PDZ1,2}$	-	-	-	-	++	1
PDZ $_{1+2}$	-	n.d.	n.d.	n.d.	-	2
DegP $_{S210A}$	++	-	-	-	+++	12, 6
DegP $_{E196K}$	-	+	-	+*	-	12, 6
DegP $_{V386A}$	+++	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

a: Komplementation der Hitzesensitivität einer *degP*-Nullmutante: +++ vollständige Komplementation; ++ Komplementation bei höherer Expression als bei +++; Komplementation bei höherer Expression als bei ++; - keine Komplementation.

b: Spaltung von Δ ssMalS: +++ vollständiger Abbau; ++ vollständiger Abbau, jedoch langsamer als bei +++; + unvollständiger Abbau; - kein Abbau.

c: Spaltung von reduziertem gefaltetem MalS: : +++ vollständiger Abbau bei > 37 °C, partieller Abbau bei < 37 °C ; ++ vollständiger Abbau ab 37 °C, jedoch langsamer als bei +++; - kein Abbau.

d: Spaltung von Resorufin-markiertem Casein: +++ Aktivität von DegP; + 5 - 10 % der Aktivität von DegP; - $< 0,1$ % der Aktivität von DegP; # Verlust der proteolytischen Aktivität ab 37 °C; * Reduktion der proteolytischen Aktivität ab 32 °C.

e: Unterstützung der Faltung von Δ ssMalS anhand der Titrationsexperimente: +++ Effekt vergleichbar zu DegP $_{S210A}$; ++ höhere Proteinkonzentration erforderlich für einen zu DegP $_{S210A}$ vergleichbaren Effekt; - kein spezifischer Effekt feststellbar.

f: Die Bestimmung des oligomeren Status der Proteine erfolgte durch eine Gelfiltration; * (Waller und Sauer, 1996).

n.d.: nicht durchgeführt.

Da natives MalS von den DegP-Derivaten nicht abgebaut wurde, führt die Deletion einer oder beider PDZ-Domänen nicht zu einer „falschen“ Erkennung von Substraten und damit einem wahllosen Abbau von intakten Proteinen. Auch für DegP ist für die Substraterkennung das Öffnen der Disulfidbrücke in MalS notwendig. Bei einem Fusionsprotein war zuvor beobachtet worden, daß das Öffnen der Disulfidbrücke für einen Angriff durch DegP notwendig ist (Kolmar et al., 1996), und auch bei der Clp-Protease (Kessel et al., 1995) und dem 20S Proteasom von *Thermoplasma acidophilum* (Wenzel und Baumeister, 1995) ist das Lösen der Disulfidbrücke im Substrat für eine Proteolyse notwendig. Wahrscheinlich haben die

Substrate durch die Disulfidbrücke eine zu ausgedehnte Struktur und eine Aufnahme in die Bindetasche ist nicht möglich. Dies könnte aber als Kontrollmechanismus dienen, um eine Spaltung von nativen Proteinen zu verhindern.

Die Deletion der PDZ1- oder PDZ2-Domäne hatte keinen Einfluß auf die Chaperonaktivität; eine Deletion beider PDZ-Domänen hatte nur eine geringe Verminderung zu Folge. Die PDZ-Domänen selber wiesen keine Chaperonaktivität auf. Die PDZ-Domänen in DegP haben also für die Chaperonaktivität keine Bedeutung. Die für eine Chaperonaktivität wichtigen Elemente scheinen auf die katalytischen Domänen beschränkt zu sein. Diese Hypothese wird auch durch die Punktmutante DegP_{E196K} unterstützt. Es ist eine Mutante in der katalytischen Domäne, und nicht nur die proteolytische Aktivität ist stark verschlechtert, sondern auch die Chaperonaktivität ist verlorengegangen. Auch das Auftreten eines wahrscheinlich proteolytisch inaktiven DegP-Homologs in *Rickettsia tsutsugamushi*, bei dem die Aminosäuren der katalytischen Triade fehlen, die „katalytische“ Domäne jedoch vorhanden ist, spricht für diese Hypothese (Bass et al., 1996). Die experimentellen Daten dieser Arbeit unterstützen nicht das theoretische Modell von Pallen und Wren (Pallen und Wren, 1997). Diese Autoren postulieren aufgrund der peptidbindenden Eigenschaften von PDZ-Domänen (Saras und Heldin, 1996) eine Beteiligung bei einer möglichen Chaperonaktivität von DegP. Aufgrund der experimentellen Ergebnisse dieser Arbeit werden die peptidbindenden Eigenschaften der PDZ-Domänen für die Oligomerisierung von DegP genutzt (siehe nächster Abschnitt).

Die Punktmutationen in der katalytischen Domäne, DegP_{S210A} und DegP_{E196K}, zeigten keinen Verlust der Oligomerisierung, denn diese Proteine liegen als Hexamere und Dodecamere vor. Nach der Deletion einer oder beider PDZ-Domänen war der Oligomerisierungsgrad stark herabgesetzt. Das Konstrukt ohne die PDZ2- oder ohne beide PDZ-Domänen oligomerisierte nicht mehr. Das Derivat ohne die PDZ1-Domäne bildete noch Trimere aus. Die PDZ2-Domäne muß folglich für die Trimerisierung der Moleküle notwendig sein. Die PDZ-Domänen allein dimerisierten. Für die Anordnung der Trimere zu Hexameren und Dodecameren scheinen beide PDZ-Domänen notwendig zu sein. Die N-terminalen Bereiche der beiden PDZ-Domänen variieren stark in der Aminosäuresequenz. Diese Unterschiede sollten für die spezifischen Eigenschaften der Domänen verantwortlich sein.

Die PDZ-Domänen sind demnach entscheidend für die Oligomerisierung von DegP. Auch die PDZ-Domänen von ClpX sind für eine Oligomerisierung notwendig (Levchenko et al., 1997). Bei ClpX konnte für die PDZ-Domänen auch eine Beteiligung bei der Bindung des Substrats nachgewiesen werden. Hierfür gibt es bei DegP noch keine Hinweise. Die PDZ-Domänen von ClpX zeigen eine starke Abweichung in der Aminosäuresequenz zu anderen bekannten PDZ-Domänen (Levchenko et al., 1997). Die homologen Bereiche scheinen eher für die dreidimensionale Struktur verantwortlich zu sein. Deshalb sind funktionelle Unterschiede vorstellbar.

Die Oligomerisierung der DegP-Monomere ist für die proteolytische Aktivität von zentraler Bedeutung, für die Chaperonaktivität aber nicht notwendig. Nicht untersucht wurde der Einfluß der Temperatur auf den Oligomerisierungsgrad. Möglich wäre eine zunehmende Oligomerisierung mit steigender Temperatur, und ein allosterischer Effekt könnte die proteolyti-

sche Aktivität unterstützen. Dies sind experimentelle Ansatzpunkte für zukünftige Arbeiten, um die Bedeutung der Oligomerisierung für die proteolytische Aktivität zu verstehen.

Die Struktur- und Funktionsanalyse anhand von DegP-Derivaten, bei denen einzelne Domänen deletiert sind, hat gezeigt, daß die PDZ-Domänen wichtig sind für die Oligomerisierung des Moleküls. Für die Chaperonaktivität haben die PDZ-Domänen keine Bedeutung, und die Chaperonaktivität scheint durch die Bindungstasche der katalytischen Domäne vermittelt zu werden. Für eine effiziente proteolytische Funktion von DegP sind die PDZ-Domänen essentiell. Dies könnte auf einer kooperativen Wechselwirkung der Untereinheiten durch die Oligomerisierung beruhen.

5.6 Steuerung der Funktion von DegP über die Temperatur

Die proteolytische Aktivität von DegP ist abhängig von der Inkubationstemperatur. Dies konnte mit zwei verschiedenen Substraten gezeigt werden: i) Resorufin-markiertes Casein und ii) reduziertes ungefaltetes MalS. Unterhalb von 16 °C konnte keine Spaltung der Substrate festgestellt werden. Ab 21 °C wurde eine zunehmende Spaltung festgestellt; ein deutlicher Aktivitätssprung fand ab einer Temperatur von 32 °C statt.

Natives MalS war bei allen getesteten Temperaturen resistent gegenüber der Spaltung durch DegP. Zumindest bis zu einer Temperatur von 42 °C findet eine korrekte Unterscheidung zwischen Substrat und nicht Substrat statt, und so kann eine Veränderung der Substratbindestelle mit ansteigender Temperatur ausgeschlossen werden.

Eine Reduktion der Disulfidbrücken in nativem MalS war ausreichend, um einen Abbau des Proteins durch DegP herbeizuführen. Bei 32 °C ist die Spaltung von reduziertem gefaltetem MalS ineffizient. Ein erkennbares Spaltprodukt von 68 kDa trat auf. Bei einer Proteolysetemperatur von 42 °C wurde das Protein gänzlich abgebaut. Bei höheren Temperaturen wird die Proteaseaktivität demnach stark erhöht, und auch nur leicht denaturierte Proteine werden effizient abgebaut.

Möglich wäre eine Veränderung des Substrats mit ansteigender Temperatur. Dies ist aber unwahrscheinlich, da auch reduziertes MalS nach einer Inkubation bei 42 °C keinen Verlust der enzymatischen Aktivität zeigt. Um diese Möglichkeit dennoch auszuschließen, waren kurzkettige Peptide getestet worden. Die Peptide waren in ihrer Länge so gewählt worden, daß eine Strukturveränderung in der Abhängigkeit der Temperatur auszuschließen war. Von DegP wurden diese Peptide aber nicht gespalten. Ein guter Kandidat für ein Substrat stellt nun ein synthetisches Fragment von MalS dar, in dem sich eine Erkennungs- und Spaltstelle für DegP befindet. Eine solche Spaltstelle könnte durch ein Ansequenzieren des bei 32 °C entstehenden hochmolekularen Spaltfragments von reduziertem MalS identifiziert werden.

Durch die Messung der Tyrosin-Fluoreszenz können zwei Strukturveränderungen für DegP vorgeschlagen werden. Die Tyrosin-Fluoreszenz verändert sich mit der Temperatur. Dieser Verlauf ist jedoch nicht linear, sondern diskontinuierlich mit zwei Stufen, die sich bei den Temperaturwerten der Aktivierung der proteolytischen Aktivität von DegP befinden: 22 °C und 32 °C. Eine strukturelle Veränderung in DegP muß bei diesen Temperaturen eintreten. Sie könnte einen regulativen Einfluß auf die Proteaseaktivität haben. Dies ist auch ein

weiterer Hinweis, daß die Temperaturabhängigkeit der Proteolyse nicht auf einer Veränderung des Substrates beruht, sondern direkt auf DegP.

DegP_{S210A} agiert bei allen getesteten Temperaturen nur als Chaperon. Die Ausbildung von Disulfidbrücken in MaS wird auch bei 42 °C unterstützt. DegP hat zwei Funktionen: Chaperon und Protease. Eine Chaperonaktivität von DegP ist nur bei niedrigen Temperaturen feststellbar. Durch die Temperaturerhöhung wird die Chaperon- durch die zunehmende Proteaseaktivität überlagert. So entsprechen die Mengen an reduziertem und oxidiertem MaS nach einer Rückfaltung in der Gegenwart von DegP der bei DegP_{S210A}. Bei einer Faltungstemperatur von 37 °C oder 42 °C baut DegP hingegen reduziertem MaS ab, der Anteil an oxidiertem MaS ist geringer und deshalb ist die gesamte MaS-Menge vermindert.

Wie könnte der Mechanismus der Aktivierung der Proteaseaktivität aussehen? Der einzige Unterschied zwischen DegP und DegP_{S210A} ist das Serin des aktiven Zentrums. Beide Proteine haben eine identische Sekundärstruktur (Skórko-Glonek et al., 1995a). Welche der beiden Funktionen von DegP aktiv ist, könnte durch die Zugänglichkeit des Serin-210 bestimmt werden. Als hypothetischer Mechanismus für die Aktivierung der Proteasefunktion wird eine temperaturabhängige Tertiärstrukturveränderung vorgeschlagen. Das Serin befindet sich nach der Sekundärstrukturvorhersage in einer Schleife, die beiden anderen Aminosäuren der katalytischen Triade sind hingegen in einer α -Helix fixiert. Die Lokalisierung in der Schleife könnte dem Serin eine räumliche Flexibilität verleihen. Durch eine Temperaturerhöhung wird das Serin-210 in die räumliche Nähe des Histidin-105 und Aspartat-135 der Triade gebracht, und es kann so das Zusammenspiel der drei für die proteolytische Aktivität wichtigen Reste stattfinden (Abbildung 5-4).

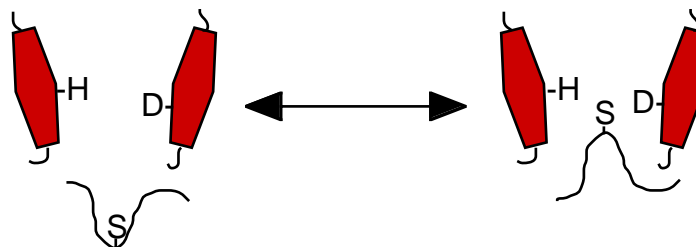


Abb. 5-4. Modell der Serinzugänglichkeit.

Welche der beiden Konformationen vorliegt, wird durch die Temperatur bestimmt. Im inaktiven Zustand ist die katalytische Triade unterbrochen (linke Konformation). Bei Temperaturen, bei denen DegP proteolytisch aktiv ist, liegt die rechte Konformation vor. α -helikale Bereiche sind rot dargestellt. Die Reste der katalytischen Triade (Histidin-105, Aspartat-135 und Serin-210) sind im Ein-Buchstaben-Code wiedergegeben.

Aufgrund der Strukturdaten kristallisierter Proteasen der gleichen Familie ist bekannt, daß sich die katalytische Triade im Zentrum der Bindungstasche befindet. Eine Konformationsänderung bräuchte deshalb nicht die Substratbindetasche zu betreffen, und so ist eine Bindung des Substrats bei allen Temperaturen ermöglicht. Das Substrat hat bei niedrigen Temperaturen, bei denen DegP ausschließlich als Chaperon aktiv ist, die Chance, durch viele Zyklen von Bindung und Freisetzung die native Konformation zu erreichen. Bei hoher Temperatur, bei der DegP zusätzlich eine starke Proteaseaktivität entfaltet, steht hierfür nur wenig Zeit zur Verfügung. Wenn diese nicht ausreichend für eine Faltung ist, wird der Weg der Proteolyse eingeschlagen und das Substrat einem schnellen Abbau zugeführt.

Als Ansatzpunkt für weitere Arbeiten, sollte die Serinzugänglichkeit in der Abhängigkeit der Temperatur betrachtet werden. Möglichkeiten für experimentelle Versuche sind ein Austausch des Serins gegen ein Tryptophan oder Cystein. Durch den Tryptophanaustausch ließe sich eine Veränderung des aktiven Zentrums über eine Veränderung der Fluoreszenz nachweisen. Der Cysteinaustausch ermöglicht die Zugänglichkeit in Abhängigkeit der Temperatur mit einem Crosslinker zu prüfen. Dieser könnte aus einem einfachen Peptid oder sogar einem ganzen Protein bestehen.

Der Wechsel vom Chaperon zur Protease ist bei DegP über die Temperatur gesteuert. Mit steigender Temperatur nimmt die proteolytische Aktivität zu und überlagert die Chaperonaktivität. Als Regulationsmechanismus für diesen Wechsel kann eine Konformationsänderung, die die Zugänglichkeit des Serins der katalytischen Triade kontrolliert, vorgeschlagen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

Altman, E., Kumamoto, C. A. und Emr, S. (1991). Heat-shock proteins can substitute for SecB function during protein export in *Escherichia coli*. *EMBO J.* *10*, 239-245.

Anfinsen, C. B. (1973). Principles that govern the folding of protein chains. *Science* *181*, 223-230.

Arakawa, T., Hung, L. und Narhi, L. (1992). Stability of fungal alpha-amylase in sodium dodecylsulfate. *J. Protein Chem.* *11*, 111-117.

Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Kunzler, P. und Thony-Meyer, L. (1998). Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* c-type cytochrome subunits of the cbb3 oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *251*, 744-747.

Åslund, F. und Beckwith, J. (1999). Bridge over troubled waters: sensing stress by disulfide bond formation. *Cell* *96*, 751-753.

Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C. und Bardwell, J. C. A. (1999). Oxidative protein folding is driven by the electron transport system. *Cell* *98*, 217-227.

Banexy, F. und Georgiou, G. (1991). Construction and characterization of *Escherichia coli* strains deficient in multiple secreted proteases: Protease III degrades high molecular weight substrates. *J. Bacteriol.* *173*, 2696-2703.

Barbieri, J. T., Pizza, M., Cortina, G. und Rappouli, R. (1990). Biochemical and biological activities of recombinant S1 subunits of pertussis toxin. *Infect. Immun* *58*, 999-1003.

Bardwell, J. C., Lee, J. O., Jander, G., Martin, N., Belin, D. und Beckwith, J. (1993). A pathway for disulfide bond formation *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* *90*, 1038-42.

Bardwell, J. C., McGovern, K. und Beckwith, J. (1991). Identification of a protein required for disulfide bond formation *in vivo*. *Cell* *67*, 581-9.

Bass, S., Gu, Q. und Christen, A. (1996). Multicopy suppressors of *prc* mutant *Escherichia coli* include two HtrA (DegP) protease homologs (HhoAB), DksA, and a truncated RlpA. *J. Bacteriol.* *178*, 1154-1161.

Baumler, A. J., Kusters, J. G., Stojiljkovic, I. und Heffron, F. (1994). *Salmonella typhimurium* loci involved in survival within macrophages. *Infect. Immun.* *62*, 1623-1630.

Beil, A. (1999). Untersuchung zur Proteinfaltung und -degradation in *E. coli*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz.

- Beissinger, M. und Buchner, J. (1998). How chaperones fold proteins. *Biol. Chem.* *379*, 245-259.
- Betton, J.-M., Sasson, N., Hofnung, M. und Laurent, M. (1998). Degradation *versus* aggregation of misfolded maltose-binding protein in the periplasm of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* *273*, 8897-8902.
- Boel, E., Brady, L., Brzozowski, A. M., Derewenda, Z., Dodson, G. G., Jensen, V. J., Petersen, S. B., Swift, H., Thim, L. und Woldike, F. (1990). Calcium binding in α -amylases: an X-ray diffraction study at 2.1-Å resolution of two enzymes from *Aspergillus*. *Biochemistry* *29*, 6244-6249.
- Bolivar, F., Rodriguez, R. L., Greene, P. J., Betlach, M. C., Hegneker, H. L. und Boger, H. W. (1977). Construction and characterization of new cloning vehicles
II. A multipurpose cloning system. *Gene* *2*, 95-113.
- Boos, W. und Shuman, H. (1998). Maltose/Maltodextrin system of *Escherichia coli*: transport, metabolism, and regulation. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* *62*, 204-229.
- Bothmann, H. und Plückthun, A. (1998). Selection for a periplasmic factor improving phage display and functional periplasmic expression. *Nature Biotech.* *16*, 376-380.
- Boyd, D., Manoil, C. und Beckwith, J. (1987). Determinants of membrane protein topology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *84*, 8525-8529.
- Buchner, J., Grallert, H. und Jacob, U. (1998). Analysis of chaperone function using citrate synthase as nonnative substrate protein. In *Molecular Chaperones*, G. H. Lorimer and T. O. Baldwin, eds. (San Diego: Academic Press Inc), pp. 323-339.
- Buisson, G., Duée, E., Haser, R. und Payan, F. (1987). Three dimensional structure of porcine pancreatic α -amylase at 2.9 Å resolution. Role of calcium in structure and activity. *EMBO J.* *6*, 3909-3916.
- Bukau, B. und Horwich, A. L. (1998). The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. *Cell* *92*, 351-366.
- Casadaban, M. J. (1976). Transposition and fusion of the *lac* genes to selected promoters in *Escherichia coli* using bacteriophage λ and Mu. *J. of Mol. Biol.* *104*, 541-555.
- Cavard, D. (1995). Role of DegP protease on levels of various forms of colicin A lysis protein. *FEMS Microbiol. Lett.* *125*.

- Cavard, D., Lazdunski, C. und Howard, S. P. (1989). The acetylated precursor form of the colicin A lysis protein is a natural substrate of the DegP protease. *J. Bacteriol.* *171*, 6316-6322.
- Chabalgoity, J. A., Khan, C. M., Nash, A. A. und Hormaeche, C. E. (1996). A *Salmonella typhimurium htrA* live vaccine expressing multiple copies of a peptide comprising amino acids 8-23 of *Herpes simplex* virus glycoprotein D as a genetic fusion to tetanus toxin fragment C protects mice from *Herpes simplex* virus infection. *Mol. Microbiol.* *19*, 791-801.
- Chang, A. C. Y. und Cohen, S. N. (1978). Construction and characterization of amplifiable multicopy DNA cloning vehicles derived from p15A cryptic miniplasmids. *J. Bacteriol.* *134*, 1141-1156.
- Chatfield, S. N., Strahan, K., Pickard, D., Charles, I. G., Hormaeche, C. E. und Dougan, G. (1992). Evaluation of *Salmonella typhimurium* strains harbouring defined mutations in *htrA* and *aroA* in the murine salmonellosis model. *Microb. Pathogen* *12*, 145-151.
- Chen, R. und Henning, U. (1996). A periplasmic protein (Skp) of *Escherichia coli* selectively binds a class of outer membrane proteins. *Mol. Microbiol.* *19*, 1287-1294.
- Chung, C. T., Niemala, S. L. und Mitter, R. H. (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli* : Transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *86*, 2172-2175.
- Clayton, C. L., Kleanthous, H., Morgan, D. D., Puckey, L. und Tabaqchali, S. (1993). Rapid fingerprinting of *Helicobacter pylori* by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. *J. Clin. Microbiol.* *31*, 1420-1425.
- Clubb, R. T., Ferguson, S. B., Walsh, C. T. und Wagner, G. (1994). Three-dimensional solution structure of *Escherichia coli* periplasmic cyclophilin. *Biochemistry* *33*, 2761-2772.
- Cooper, T. G. (1980). *Biochemische Arbeitsmethoden* (Berlin New York: Walter de Gruyter).
- Da Costa, M., Guillou, J. P., Garin-Basuji, B., Thiebaud, J. und Dubray, G. (1996). Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. *J. Appl. Bacteriol.* *81*, 267-275.
- Dalbey, R. E. und Heijne v. , G. (1992). Signalpeptidases in prokaryotes and eukaryotes- a new protease family. *Trends Biochem. Sci.* *17*, 474-478.
- Danese, P., Oliver, G. R., Barr, K., Dowman, G. D., Rick, P. D. und Silhavy, T. J. (1998). Accumulation of the enterobacterial common antigen lipid II biosynthetic intermediate stimulates *degP* transcription in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* *180*, 5875-5884.

- Danese, P. N. und Silhavy, T. J. (1997). The σ^E and the Cpx signal transduction systems contro the snthesis of periplasmic protein-folding enzymes in *Escherichia coli*. *Genes & Dev.* *11*, 1183-1193.
- Danese, P. N., Snyder, W. B., Cosma, C. L., Davis, L. J. B. und Silhavy, T. J. (1995). The cpx two-component signal transduction pathway of *Escherichia coli* regulates transcription of the gene specifying the stress-inducible periplasmic protease, DegP. *Gene & Development* *9*, 387-398.
- Dassa, E. und Hofnung, M. (1985). Sequence of gene *malG* in *E. coli* K12: homologies between integral membrane components from binding protein-dependent transport systems. *EMBO J.* *4*, 2287-2293.
- de Cock, H., Schäfer, U., Potgeter, M., Demel, R., Müller, M. und Tommassen, J. (1999). Affinity of the periplasmic chaperone Skp of *Escherichia coli* for phospholipids, lipopolysaccharides and non-native outer membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* *259*, 96-103.
- Derman, A., Prinz, W., Belin, D. und Beckwith, J. (1993). Mutations that allow disulfide bond formation in the cytoplasm of *Escherichia coli*. *Science* *262*, 1744-1747.
- Derman, A. I. und Beckwith, J. (1991). *Escherichia coli* alkaline phosphatase fails to acquire disulfide bonds when retained in the cytoplasm. *J. Bacteriol.* *173*, 7719-7722.
- Diamond, D. L., Strobel, S., Chun, S.-Y. und Randall, L. L. (1995). Interaction of SecB with intermediates along the folding pathway of maltose-binding protein. *Protein Science* *4*, 1118-1123.
- Dong, J., Iuchi, S., Kwan, H. S., Lu, Z. und Lin, E. C. (1993). The deduced amino-acid sequence of the cloned cpxR gene suggests the protein is the cognate regulator for the membrane sensor, CpxA, in a two-component signal transduction system of *Escherichia coli*. *Gene* *136*, 227-230.
- Fabret, C. und Hoch, J. A. (1998). A two-component signal transduction system essential for growth of *Bacillus subtilis*: implications for anti-infective therapy. *J. Bacteriol.* *180*, 6375-6383.
- Fairbanks, G., Steck, T. L. und Wallach, D. F. (1971). Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry* *10*, 2606-2617.
- Fanning, A. S. und Anderson, J. M. (1996). Protein-protein interactions: PDZ domain networks. *Curr. Biol.* *6*, 1385-1388.
- Feller, G., Lonhienne, T., Deroanne, C., Libioulle, C., Van Beeumen, J. und Gerday, C. (1992). Purification, characterization, and nucleotide sequence of the thermolabile alpha-

amylase from the antarctic psychrotroph *Alteromonas haloplanctis* A23. J. Biol. Chem. 267, 5217-5221.

Fenton, W. A., Kashi, Y., Furtak, K. und Horwich, A. L. (1994). Residues in chaperonin GroEL required for polypeptide binding and release. Nature 371, 614-619.

Fischer, G., Bang, H. und Mech, C. (1984). Determination of enzymatic catalysis for the *cis-trans*-isomerization of peptide binding in proline-containing peptides. Biomed. Biochim. Acta 10, 1101-1111.

Fitts, R., Reuveny, Z., van Amsterdam, J., Mulholland, J. und Botstein, D. (1987). Substitution of tyrosine for either cysteine in β -lactamase prevents release from the membrane during secretion. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 8540-8543.

Frech, C. und Schmid, F. X. (1995). DsbA-mediated disulfide bond formation and catalyzed prolyl isomerization in oxidative protein folding. J. Biol. Chem. 270, 5367-5374.

Freedman, R. B., Hirst, T. R. und Tuite, M. F. (1994). Protein disulphide isomerase: building bridges in protein folding. Trends Biochem. Sci. 19, 331-336.

Freundlieb, S. und Boos, W. (1986). α -Amylase of *Escherichia coli*, mapping and cloning of the structural gene, *malS*, and identification of its product as a periplasmic protein. J. Biol. Chem. 261, 2946-2953.

Freundlieb, S., Ehmann, U. und Boos, W. (1988). Facilitated diffusion of p-nitrophenyl- α -D-maltohexaoside through the outer membrane of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem. 263, 314-320.

Froshauer, S. und Beckwith, J. (1984). The nucleotide sequence of the gene for MalF protein, an inner membrane component of the maltose transport system of *Escherichia coli*. J. Biol. Chem 259, 10896-10903.

Gilbert, H. F. (1993). Protein Folding, R. Pain, ed. (Oxford: Oxford Press).

Gill, S. C. und von Hippel, P. H. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. Anal. Biochem. 182, 319-326.

Glover, J. und Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. Cell 94, 73-82.

Goodwin, M. G. und Anthony, C. (1996). Characterization of a novel methanol dehydrogenase containing a Ba²⁺ ion at the active site. Biochem. J. 318, 673-679.

- Gottermann, S. (1997). Klonierung und Charakterisierung der Komponenten eines ABC-Transporters von *Thermococcus litoralis*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz.
- Gottesman, S., Wickner, S. und Maurizi, M. R. (1997). Protein quality control: triage by chaperones and proteases. *Genes Dev.* *11*, 815-823.
- Guigueno, A., Belin, P. und Boquet, P. L. (1997). Defective export in *Escherichia coli* caused by DsbA'-PhoA hybrid proteins whose DsbA' domain cannot fold into a conformation resistant to periplasmic proteases. *J. Bacteriol.* *179*, 3260-3269.
- Guzman, L.-M., Belin, D., Carson, M. J. und Beckwith, J. (1995). Tight regulation, modulation and high-level expression by vectors containing the arabinose P_{BAD} Promoter. *J. Bac.* *177*, 4121-4130.
- Hatada, Y., Igarashi, K., Ozaki, K., Ara, K., Hitomi, J., Kobayshi, T., Kawai, S., Watabe, T. und Ito, S. (1996). Amino acid sequence and molecular structure of an alkaline amylopullulanase from *Bacillus* that hydrolyzes alpha-1,4 and alpha-1,6 linkages in polysaccharides at different active sites. *J. Biol. Chem.* *271*, 24075-24083.
- Hayano, T. (1991). Two distinct forms of peptidylprolyl-*cis-trans*-isomerase are expressed separately in periplasmic and cytoplasmic compartments of *Escherichia coli* cells. *Biochem.* *30*, 3041-3048.
- Hayhurst, A. und Harris, W. J. (1999). *Escherichia coli* skp chaperone coexpression improves solubility and phage display of single-chain antibody fragments. *Protein Expr. Purif.* *15*, 336-343.
- Hengge, R. und Boos, W. (1983). Maltose and lactose transport in *Escherichia coli*. Examples of two different types of concentrative transport systems. *Biochim. Biophys. Acta* *737*, 443-478.
- Hesterkamp, T., Hauser, S., Lutcke, H. und Bukau, B. (1996). *Escherichia coli* trigger factor is a prolyl isomerase that associates with nascent polypeptide chains. *Proc. Natr. Acad. Sci. USA* *93*, 4437-4441.
- Hofnung, M., Schwartz, M. und Hatfield, D. (1971). Complementation studies in the maltose-A region of the *Escherichia coli* K12 genetic map. *J. Mol. Biol.* *61*, 681-694.
- Holmgren, A. und Bränden, C.-I. (1989). Crystal structure of chaperone protein PapD reveals an immunoglobulin fold. *Nature* *342*, 248-251.

- Hultgren, S. J., Abraham, S., Caparon, M., Falk, P., St. Geme, I. J. W. und Normark, S. (1993). Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell* 73, 887-901.
- Inouye, H. und Beckwith, J. (1997). Synthesis and processing of an *Escherichia coli* alkaline phosphatase precursor *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 1440-1444.
- Ito, K. und Beckwith, J. (1981). Protein localization in *E. coli*: is there a common step in the secretion of periplasmic and outer-membrane proteins. *Cell* 24, 707-717.
- Itoh, T., Yamashita, I. und Fukui, S. (1987). Nucleotide sequence of the alpha-amylase gene (ALP1) in the yeast *Saccharomyces fibuligera*. *FEBS Lett.* 219, 339-342.
- Jacob, U., Muse, W., Eser, M. und Bardwell, J. C. A. (1999). Chaperone activity with a redox switch. *Cell* 96, 341-352.
- Jacobs, M., Andersen, J. B., Kontinen, V. und Sarvas, M. (1993). *Bacillus subtilis* PrsA is required *in vivo* as an extracytoplasmic chaperone for secretion of active enzymes synthesized either with or without prosequences. *Mol. Microbiol.* 8, 957-966.
- Jacq, A. und Holland, B. (1993). The components of the *Escherichia coli* protein-transport apparatus. *Curr. Opin. Struc. Biol.* 3, 541-56.
- Janecek, S. (1993). Sequence similarities in (a/b)₈ -barrel enzymes revealed by conserved regions of a-amylases. *FEBS* 316, 23-26.
- Johnson, S. H., Charles, I., Dougan, G., Pickard, D., O'Gaora, P., Costa, G., Ali, T., Miller, I. und Hormaeche, C. (1991). The role of a stress-response protein in *Salmonella typhimurium* virulence. *Mol. Microbiol.* 5, 401-407.
- Kamitani, S., Akiyama, Y. und Ito, K. (1992). Identification and characterization of an *Escherichia coli* gene required for the formation of correctly folded alkaline phosphatase, a periplasmic enzyme. *EMBO J.* 11, 57-62.
- Kellermann, O. und Szmelcman, S. (1974). Active transport of maltose in *Escherichia coli* K12. *Eur. J. Biochem.* 47, 139-149.
- Kessel, M., Maurizi, M. R., Kim, B., Kocsis, E., Trus, B. L., Singh, S. K. und Steven, A. C. (1995). Homology in structural organization between *E.coli* ClpAP protease and the eukaryotic 26S proteasome. *J. Mol. Biol.* 250, 587-594.
- Kolmar, H., Waller, P. R. H. und Sauer, R. T. (1996). The DegP and DegQ periplasmic endo-proteases of *Escherichia coli*: specificity for cleavage sites and substrate conformation. *J. Bacteriol.* 178, 5925-5929.

- Kontinen, V. P. und Tokuda, H. (1995). Overexpression of phosphatidylglycerophosphate synthase restores protein translocation in a *secG* deletion mutant of *Escherichia coli* at low temperature. *FEBS Lett.* 364, 157-160.
- Kuehn, M. J., Ogg, D. J., Kihlberg, J., Slonim, L. N., Flemmer, K., Bergfors, T. und Hultgren, S. J. (1993). Structural Basis of Pilus Subunit Recognition by the PapD Chaperone. *Science* 262, 1234-1241.
- Kumanoto, C. A. (1991). Molecular chaperones and protein translocation across the *Escherichia coli* inner membrane. *Mol. Microbiol.* 5, 1991.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamiet, A. A. und Plückthun, A. (1989). The precursor of beta-lactamase: purification, properties and folding kinetics. *EMBO J.* 8.
- Laskowska, E., Kuczynska-Wisnik, D., Skorko-Glonek, J. und Taylor, A. (1996). Degradation by proteases Lon, Clp and HtrA, of *Escherichia coli* proteins aggregated *in vivo* by heat shock; HtrA protease action *in vivo* and *in vitro*. *Mol. Microbiol.* 22, 555-571.
- Lecker, S., Driessen, A. J. M. und Wickner, W. (1990). ProOmpA contains secondary and tertiary structure prior to translocation and is shielded from aggregation by association with SecB protein. *EMBO J.* 9, 2309-2314.
- Levchenko, I., Smith, C. K., Walsh, N. P., Sauer, R. T. und Baker, T. A. (1997). PDZ-like domains mediate binding specificity in the Clp/Hsp100 family of chaperones and protease regulatory subunits. *Cell* 91, 939-947.
- Levine, M. M., Galen, J., Barry, E., Noriega, F., Chatfield, S., Sztein, M., Dougan, G. und Tacket, C. (1996). Attenuated *Salmonella* as live oral vaccines against typhoid fever and as live vectors. *J. Biotechnol.* 44, 193-196.
- Lipinska, B., Sharma, S. und Georgopoulos, C. (1988). Sequence analysis and regulation of the *htrA* gene of *Escherichia coli* : a σ^{32} -independent mechanism of heat-inducible transcription. *Nucleic Acids Research* 16, 10053-10067.
- Lipinska, B., Zyllicz, M. und Georgopoulos, C. (1990). The HtrA (DegP) protein, essential for *Escherichia coli* survival at high temperatures, is an endopeptidase. *J. Bacteriol.* 172, 1791-1797.

Loosmore, S. M., Yang, Y.-P., Oomen, R., Shortreed, J. M., Coleman, D. C. und Klein, M. H. (1998). The *Haemophilus influenzae* HtrA protein is a protective antigen. *Infection and Immunity* 66, 899-906.

Lorentz, K. (1983). Evaluation of α -amylase assays with 4-nitrophenyl- α -oligosaccharides as substrates. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 21, 463-471.

Lovett, S. T. und Kolodner (1991). Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* recJ chromosomal region and construction of recJ-overexpression plasmids. *J. Bacteriol.* 173, 353-364.

Luckey, M., Ling, R., Dose, A. und Malloy, B. (1991). Role of a disulfide bond in the thermal stability of the LamB protein trimer in *Escherichia coli* outer membrane. *J. Biol. Chem.* 266, 1866-1871.

MacGregor, E. A. und Svensson, B. (1989). A super-secondary structure predict to be common to several α -1,4-D-glucan-cleaving enzymes. *Biochem. J.* 259, 145-152.

Matsumura, M., Signor, G. und Matthews, B. W. (1991). Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature* 342, 291-293.

Matsuyama, S.-I., Fujita, Y. und Mizushima, S. (1993). SecD is involved in the release of translocated secretory proteins from the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12, 265-270.

Miller, J. (1972). *Experiments in molecular genetics* (Cold Spring Harbour, NY: Cold Spring Harbour Laboratory).

Missiakas, D., Georgopoulos, C. und Raina, S. (1994). The *Escherichia coli* dsbC (*xprA*) gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* 13, 2013-2020.

Missiakas, D. und Raina, S. (1998). The extracytoplasmic function sigma factors: role and regulation. *Mol. Microbiol.* 28, 1059-1066.

Missiakas, D. und Raina, S. (1997a). Protein folding in the bacterial periplasm. *J. Bacteriol.* 179, 2465-2471.

Missiakas, D. und Raina, S. (1997b). Protein misfolding in the cell envelope of *Escherichia coli*: new signaling pathways. *Trends Biochem. Sci.* 22, 59-63.

Missiakas, D. und Raina, S. (1997c). Signal transduction pathways in response to protein misfolding in the extracytoplasmic compartments of *E. coli*: role of two new phosphoprotein phosphatases PrpA and PrpB. *EMBO J.* 16, 1670-1685.

Missiakas, D., Schwager, F. und Raina, S. (1995). Identification and characterization of a new disulfide isomerase-like protein (DsbD) in *Escherichia coli*. *EMBO J.* 14, 3415-3424.

Neuhoff, V., Arold, N., Taube, D. und Ehrhardt, W. (1988). Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis* 9, 255-262.

Nichtl, A., Buchner, J., Jaenicke, R., Rudolph, R. und Scheibel, T. (1998). Folding and association of β -galactosidase. *J. Mol. Biol.* 282, 1083-1091.

Nishiyama, K., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1992). The carboxyl terminal region of SecE interacts with SecQ and is functional in the reconstitution of protein translocation activity in *Escherichia coli*. .

Nishiyama, K., Mizushima, S. und Tokuda, H. (1993). A novel membrane protein involved in protein translocation across the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *EMBO J.* 12, 3409-3415.

Oliver, D. B. (1993). SecA protein: autoregulated ATPase catalysing preprotein insertion and translocation across the *Escherichia coli* preprotein translocase. *Mol. Microbiol.* 7, 159-165.

Pallen, M. J. und Wren, B. W. (1997). The HtrA family of serine proteases. *Mol. Microbiol.* 26, 209-221.

Palmer, T. N., Ryman, B. E. und Whelan, W. J. (1976). The action pattern of amyloamylase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 69, 105-115.

Park, S., Liu, G., Topping, T. B., Cover, W. H. und Randall, L. L. (1988). Modulation of folding pathways of exported proteins by the leader sequence. *Science* 239, 1033-1035.

Pogliano, J., Lynch, A. S., Berlin, D., Lin, E. C. C. und Beckwith, J. (1997). Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes & Dev.* 11, 1169-1182.

Ponting, C. P. (1997). Evidence for PDZ domains in bacteria, yeast, and plants. *Protein Sci.* 6, 464-468.

Prinz, W. A., Spiess, C., Ehrmann, M., Schierle, C. und Beckwith, J. (1996). Targeting of signal sequenceless proteins for Export in *Escherichia coli* with altered protein translocase. *EMBO J.* 15, 5209-5217.

Pugsley, A. P. (1993). The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57, 50-108.

- Pugsley, A. P. und Dubreuil, C. (1988). Molecular characterization of *malQ*, the structural gene for the *Escherichia coli* enzyme amyloamylase. *Mol. Microbiol.* 2, 473-479.
- Randall, L. L. und Hardy, S. J. S. (1995). High selectivity with low specificity: how SecB has solved the paradox of chaperone binding. *Trends Biochem. Sci.* 20, 65-69.
- Randall, L. L., Topping, T. B. und Hardy, S. J. S. (1990). No specific recognition of leader peptide by SecB, a chaperone involved in protein export. *Science* 248, 860-863.
- Rawlings, N. D. und Barret, A. J. (1994). Families of serine peptidases. In *Method. Enzymol.* (San Diego: Academic Press Inc), pp. 19-61.
- Rawlings, N. D. und Barrett, A. J. (1999). MEROPS: the peptidase database. *Nucleic Acids Res.* 27, 325-331.
- Richarme, G. und Caldas, T. D. (1997). Chaperone properties of the bacterial periplasmic substrate-binding proteins. *J. Biol. Chem.* 272, 15607-15612.
- Roberts, M., Li, J., Bacon, A. und Chatfield, S. (1998). Oral vaccination against tetanus: comparison of the immunogenicities of *Salmonella* strains expressing fragment C from the *nirB* and *htrA* promoters. *Infect. Immun.* 66, 3080-3087.
- Rosen, B. P. (1987). . In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, F. C. Neidhardt, ed. (Washington D. C.: American Society for Microbiology), pp. 760-767.
- Rost, B. und Sander, C. (1994). Combining evolutionary information and neural networks to predict protein secondary structure. *Proteins* 19, 55-72.
- Rost, B., Sander, C. und Schneider, R. (1994). PHD - an automatic mail server for protein secondary structure prediction. *Comput. Appl. Biosci.* 10, 53-60.
- Roudiak, S. G., Seth, A., Knipfer, N. und Shrader, T. E. (1998). The lon protease from *Mycobacterium smegmatis*: molecular cloning, sequence analysis, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry* 37, 377-386.
- Rudd, K. E., Sofia, H. J. und v. Koonin, E. (1995). A new family of peptidyl-prolyl isomerases. *Trends Biochem. Sci.* 20, 12-14.
- Ruddock, L. W., Hirst, T. R. und Freedman, R. B. (1996). pH-dependence of the dithiol-oxidizing activity of DsbA (a periplasmic protein thiol: disulphide oxidoreductase) and protein disulphide -isomerase: studies with a novel simple peptide substrate. *Biochem. J.* 315, 1001-1005.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. (Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory).

Sander, A., Posselt, M., Bohm, N., Ruess, M. und Altwegg, M. (1999). Detection of *Bartonella henselae* DNA by two different PCR assays and determination of the genotypes of strains involved in histologically defined cat scratch disease. *J. Clin. Microbiol.* 37, 993-997.

Saras, J. und Heldin, C. H. (1996). PDZ domains bind carboxy-terminal sequences of target proteins. *Trends Biochem. Sci.* 21, 455-458.

Savel'ev, A., Novikova, L., Kovaleva, I., Luzikov, V., Neupert, W. und Langer, T. (1998). ATP-dependent proteolysis in mitochondria. m-AAA protease and PIM1 protease exert overlapping substrate specificities and cooperate with the mtHsp70 system. *J. Biol. Chem.* 273, 20596-20602.

Schäfer, U., Beck, K. und Müller, M. (1999). Skp, a molecular chaperone of gram-negative bacteria, is required for the formation of soluble periplasmic intermediates of outer membrane proteins. *J. Biol. Chem.* 274, 24567-24574.

Schirmer, T., Keller, T. A., Wang, Y. F. und Rosenbusch, J. P. (1995). Structural basis for sugartranslocation through maltoporin channels at 3.1 Å resolution. *Science* 267.

Schmid, F. X. (1989). Spectral methods for characterizing protein conformation and conformational changes, T. E. Creighton, ed. (Oxford, New York, Tokio: IRL Press).

Schneider, E., Freundlieb, S., Tapio, S. und Boos, W. (1992). Molecular characterization of the MalT-dependent periplasmic alpha-amylase of *Escherichia coli* encoded by *mals*. *J. Biol. Chem.* 267, 5148-54.

Schultz, S. C., Dalbadie-MacFarland, G., Neitzel, J. J. und Richards, J. H. (1987). Stability of wild-type and mutant RTEM-1 β -lactamases: effect of the disulfide bond. *Proteins* 2, 290-297.

Schumann, W. (1999). FtsH--a single-chain charonin? *FEMS Microbiol. Rev.*, 1-11.

Schurr, M. J., Yu, H., Martinez-Salazar, J. M., Boucher, J. C. und Deretic, V. (1996). Control of AlgU, a member of the sigma E-like family of stress sigma factors, by the negative regulators MucA and MucB and *Pseudomonas aeruginosa* conversion to mucoidy in cystic fibrosis. *J. Bacteriol.* 178, 4997-5004.

Schwartz, M. (1987). The Maltose Regulon. In *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and Molecular Biology, F. C. Neidhardt, ed. (Washington, D. C.: American Society of Microbiology), pp. 1482-1502.

- Schwartz, M. und Hofnung, M. (1967). La maltodextrine phosphorylase d'*Escherichia coli*. Eur. J. Biochem. 2, 132-145.
- Seol, J. H., Woo, S. K., Jung, E. M., Yoo, S. J., Lee, C. S., Kim, K. J., Tanaka, K., Ichihara, A., Ha, D. B. und Chung, C. H. (1991). Protease Do is essential for survival of *Escherichia coli* at high temperatures: its identity with the *htrA* gene product. Biochem. Biophys. Res. Commun. 176, 730-736.
- Shibuya, I., Tamura, G., Ishikawa, T. und Hara, S. (1992). Overproduction of an alpha-amylase/glucoamylase fusion protein in *Aspergillus oryzae* using a high expression vector. Biosci. Biotechnol. biochem. 56, 174-179.
- Shuman, H. A. (1982). Active transport of maltose in *E.coli* K12. J. Biol. Chem.. 257, 5455-5461.
- Silhavy, T. J., Berman, M. L. und Enquist, L. W. (1984). Experiments with gene fusions (Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory).
- Skórko-Glonek, J., Krzewski, K., Lipinska, B., Bertoli, E. und Tanfani, F. (1995a). Comparison of the structure of wild-type heat shock protease and mutant HtrA proteins. J. Biol. Chem. 270, 11140-11146.
- Skórko-Glonek, J., Wawrzynów, A., Krzewski, K., Kurpierz, K. und Lipinska, B. (1995b). Site-directed mutagenesis of the HtrA (DegP) serine protease, whose proteolytic activity is indispensable for *Escherichia coli* survival at elevated temperatures. Gene 163, 47-52.
- Snyder, W. B., Davis, L. J. B., Danese, P. N., Cosma, C. L. und Silhavy, T. J. (1995). Overproduction of NlpE, a new outer membrane lipoprotein suppresses the toxicity of periplasmic LacZ by activation of the Cpx signal transduction pathway. J. Bacteriol. 177, 4216-4223.
- Sone, M., Sishigami, S., Yoshihisa, T. und Ito, K. (1997). Roles of disulfide bonds in bacterial alkaline phosphatase. J. Biol. Chem. 272, 6174-6178.
- Songyang, Z., Fanning, A. S., Fu, C., Xu, J., Marfatia, S. M., Chishti, A. H., Crompton, A., Chan, A. C., Anderson, J. M. und Cantley, L. C. (1997). Recognition of unique carboxyl-terminal motifs by distinct PDZ domains. Science 275, 73-77.
- Specka, U. und Mayer, F. (1993). Cellular location, activity states, and macromolecular organization of glucoamylase in *Clostridium thermosaccharolyticum*. Arch. Microbiol. 160, 284-287.
- Specka, U., Spreinat, A., Antranikian, G. und Mayer, F. (1991). Immunocytochemical identification and localization of active and inactive α -amylase and pullulanase in cells of *Clostridium thermosulfurogenes* EM1. Appl. Env. Microbiol. 57, 1062-1069.

- Spiess, C. (1995). Proteinfaltung und Aktivität von MalS, einer α -Amylase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Fakultät für Biologie, Universität Konstanz.
- Spiess, C., Beil, A. und Ehrmann, M. (1999). A temperature-dependent switch from chaperone to protease in a widely conserved heat shock protein. *Cell* 97, 339-347.
- Spiess, C., Happersberger, H. P., Glocker, M. O., Spiess, E., Rippe, K. und Ehrmann, M. (1997). Biochemical characterization and mass spectrometric disulfide bond mapping of periplasmic α -amylase MalS of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 272, 22125-22133.
- Squires, C. L., Pedersen, S., Ross, B. M. und Squires, C. (1991). ClpB is the *Escherichia coli* heat shock protein F84.1. *J. Bacteriol.* 173, 4254-4262.
- Srere, P. A., Brazil, H. und Gonen, L. (1963). The citrate condensing enzyme of pigeon breast muscle and moth flight muscle. *Acta Chem. Scand.* 17, S129-S134.
- Stewart, E. J., Åslund, F. und Beckwith, J. (1998). Disulfide bond formation in the *Escherichia coli* cytoplasm: an *in vivo* role reversal for the thioredoxins. *EMBO J.* 17, 5543-5550.
- Strasser, A. W., Selk, R., Dohmen, R. J., Niermann, T., Bielefeld, J., Seeboth, P., Tu, G. H. und Hollenberg, C. P. (1989). Analysis of the alpha-amylase gene of *Schwanniomyces occidentalis* and the secretion of its gene product in transformants of different yeast genera. *Eur. J. Biochem.* 184, 699-706.
- Strauch, K. L. und Beckwith, J. (1988). An *Escherichia coli* mutation preventing degradation of abnormal periplasmic proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 1576-1580.
- Strauch, K. L., Johnson, K. und Beckwith, J. (1989). Characterization of *degP*, a gene required for proteolysis in the cell envelope and essential for growth of *Escherichia coli* at high temperature. *J. Bacteriol.* 171, 2689-2696.
- Svensson, B. (1994). Protein engineering in the α -amylase family: catalytic mechanism, substrate specificity, and stability. *Plant Mol. Biol.* 25, 141-157.
- Tacket, C. O., Sztein, M. B., Losonsky, G. A., Wasserman, S. S., Nataro, J. P., Edelman, R., Pickard, D., Dougan, G., Chatfield, S. N. und Levine, M. M. (1997). Safety of live oral *Salmonella typhi* vaccine strains with deletions in *htrA* and *aroC aroD* and immune response in humans. *Infect. Immun.* 65, 452-456.
- Tapio, S., Yeh, F., Shuman, H. A. und Boos, W. (1991). The *malZ* gene of *Escherichia coli*, a member of the maltose regulon, encodes a maltodextrin glucosidase. *J. Biol. Chem.* 266, 19450-19458.

- Tormo, A., Almiron, M. und Kolter, R. (1990). *surA*, an *Escherichia coli* gene essential for survival in stationary phase. *J. Bacteriol.* *172*, 4339-4347.
- Tyler, J. M. und Brandon, D. (1980). Rotary shadowing of extended molecules dried from glycerol. *J. Ultrastruct. Res.* *71*, 95-102.
- Uozumi, N., Matsuda, T., Tsukagoshi, N. und Udaka, S. (1991). Structural and functional roles of cysteine residues of *Bacillus polymyxa* β -amylase. *Biochemistry* *30*, 4594-4599.
- van Melderren, L. und Gottesman, S. (1999). Substrate sequestration by a proteolytically inactive Lon mutant. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *96*, 6064-6071.
- Vanhove, M., Guillaume, G., Ledent, P., Richards, J. H., Pain, R. H. und Frère, J.-M. (1997). Kinetic and thermodynamic consequences of the removal of the Cys-77-Cys-123 disulphide bond for the folding of TEM-1 β -lactamase. *Biochem. J.* *321*, 413-417.
- Vogl, T., Brengelmann, R., Hinz, H. J., Scharf, M., Lötzbeyer, M. und Engels, J. W. (1995). Mechanism of protein stabilization by disulfide bridges: calorimetric unfolding studies on disulfide-deficient mutants of the α -Amylase inhibitor Tendamistat. *J. Mol. Biol.* *254*, 481-496.
- Waller, P. R. H. und Sauer, R. T. (1996). Characterization of *degQ* and *degS*, *Escherichia coli* genes encoding homologs of the DegP protease. *J. Bacteriol.* *178*, 1146-1153.
- Wang, C.-C. und Tsou, C.-L. (1998). Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Lett.* *425*, 382-384.
- Watson, N., Duniak, D. S., Rosey, E. L., Slonczewski, J. L. und Olson, E. R. (1992). Identification of elements involved in transcriptional regulation of the *Escherichia coli cad* operon by external pH. *J. Bacteriol.* *174*, 530-540.
- Wawrzynow, A., Wojtowiak, D., Marszalek, J., Banecki, B., Jonsen, M., Graves, B., Georgopoulos, C. und Zylicz, M. (1995). The ClpX heat-shock protein of *Escherichia coli*, the ATP-dependent substrate specificity component of the ClpP-ClpX protease, is a novel molecular chaperone. *EMBO J.* *14*, 1867-1877.
- Wendland, M., von Figura, K. und Pohlmann, R. (1991). Mutational analysis of disulfide bridges in the M_r 46,000 mannose 6-phosphate receptor. *J. Biol. Chem.* *266*, 7132-7136.
- Wenzel, T. und Baumeister, W. (1995). Conformational constraints in protein degradation by the 20S proteasome. *Struct. Biol.* *2*, 199-204.
- Wessel, D. und Flügge, U. I. (1984). A method for the quantitative recovery of protein in dilute solution in the presence of detergents and lipids. *Anal. Biochem.* *138*, 141-143.

- Wiegand, G., Epp, O. und Huber, R. (1995). The crystal structure of porcine pancreatic α -Amylase in complex with the microbial inhibitor tendamistat. *J. Mol. Biol.* 247, 99-110.
- Wilcox, G., Clemetson, K. J., Cleary, P. und Englesberg, E. (1974). Interaction of the regulatory gene product with the operator site in the L-Arabinose operon of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 85, 589-602.
- Wild, J., Altman, E., Yura, T. und Gross, C. A. (1992). DnaK and DnaJ heat shock proteins participate in protein export in *Escherichia coli*. *Genes. Dev.* 6, 1165-1172.
- Wild, J., Rossmeissl, P., Walter, W. A. und Gross, C. A. (1996). Involvement of the DnaK-DnaJ-GrpE chaperone team in protein secretion in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 178, 3608-3613.
- Wild, J., Walter, W. A., Gross, C. A. und Altman, E. (1993). Accumulation of secretory protein precursors in *Escherichia coli* induces the heat shock response. *J. Bacteriol.* 175, 3992-3997.
- Wootton, J. C. und Drummond, M. H. (1989). The Q-linker: a class of interdomain sequences found in bacterial multidomain regulatory proteins. *Protein Eng.* 2, 535-543.
- Wulfing, C., Lombardero, J. und Plückthun, A. (1994). An *Escherichia coli* protein consisting of a domain homologous to FK506-binding proteins (FKBP) and a new metal binding motif. *J. Biol. Chem.* 269, 2895-2901.
- Wülfing, C. und Rappuoli, R. (1997). Efficient production of heat-labile enterotoxin mutant proteins by overexpression of *dsbA* in a *degP*-deficient *Escherichia coli* strain. *Arch. Microbiol.* 167, 280-283.
- Wunderlich, M. und Glockshuber, R. (1993). *In vivo* control of redox potential during protein folding catalyzed by bacterial protein disulfide-isomerase (DsbA). *J. Biol. Chem.* 268, 24547-50.
- Wunderlich, M., Otto, A., Maskos, K., Mücke, M., Seckler, R. und Glockshuber, R. (1995). Efficient catalysis of disulfide formation during protein folding with a single active-site cysteine. *J. Mol. Biol.* 247, 28-33.
- Wunderlich, M., Otto, A., Seckler, R. und Glockshuber, R. (1993). Bacterial protein disulfide isomerase: efficient catalysis of oxidative protein folding at acidic pH. *Biochemistry* 32, 12251-12256.

- Xie, Z. D., Hershberger, C. D., Shankar, S., Ye, R. W. und Chakrabarty, A. M. (1996). Sigma factor-anti-sigma factor interaction in alginate synthesis: inhibition of AlgT by MucA. *J. Bacteriol.* *178*, 4990-4996.
- Zapun, A., Missiakis, D., Raina, S. und Creighton, T. E. (1995). Structural and functional characterization of DsbC, a protein involved in disulfide bond formation in *Escherichia coli*. *Biochemistry* *34*, 5075-5089.
- Zav'yalov, V. P., Zav'yalova, G. A., Denesyuk, A. I., Gaestel, M. und Korpela, T. (1995). Structural and functional homology between periplasmic bacterial molecular chaperones and small heat shock proteins. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* *11*, 265-272.
- Zdanovsky, A. G., Kulaeva, O. I. und Yankovsky, N. K. (1992). Construction and expression of diphtheria toxin-encoding gene derivatives in *Escherichia coli*. *Gene* *116*, 81-86.
- Zettlmeissl, G., Rudolph, R. und Jaenicke, R. (1979). Reconstitution of lactic dehydrogenase. Noncovalent aggregation vs. reactivation. 1. Physical properties and kinetics of aggregation. *Biochemistry* *18*, 5567-5571.
- Zheng, M., Åslund, F. und Storz, G. (1998). Activation of the OxyR transcription factor by reversible disulfide bond formation. *Science* *279*, 1718-1721.
- Zipper, P., Kratky, O., Herrmann, R. und Hohn, T. (1971). An x-ray small angle study of the bacteriophages ϕ r and R17. *Eur. J. Biochem* *18*, 1-9.

7. ANHANG

7.1 Verzeichnis der Abbildungen

Abb. 2-1.	Reduktion von Disulfidbrücken in cytoplasmatischen Proteinen (nach Stewart et al. (Stewart et al., 1998))	6
Abb. 2-2.	Ausbildung von Disulfidbrücken in periplasmatischen Proteinen (verändertes Modell nach Missiakas und Raina (Missiakas und Raina, 1997a))	9
Abb. 2-3.	Proteinstruktur der α -lytischen Endopeptidase aus <i>Bacillus subtilis</i> (Quelle: MEROPS-the Peptidase Database)	11
Abb. 2-4.	Domänenstruktur von DegP	12
Abb. 2-5.	Regulation der <i>degP</i> -Expression (verändertes Modell nach Missiakas und Raina (Missiakas und Raina, 1997b))	13
Abb. 4-1.	Reinigung von MalS	54
Abb. 4-2.	Einfluß des pH-Wertes auf die Aktivität von MalS	56
Abb. 4-3.	Einfluß der Osmolarität auf die MalS-Aktivität	57
Abb. 4-4.	Bestimmung der kinetischen Parameter von MalS	58
Abb. 4-5.	Denaturierung von reduziertem und oxidiertem MalS durch SDS	60
Abb. 4-6.	Thermische Stabilität von MalS unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen	61
Abb. 4-7.	Reduktion und Reoxidation von MalS	62
Abb. 4-8.	Elektronenmikroskopie von nicht reduziertem und reduziertem MalS	64
Abb. 4-9.	Aminosäuresequenz und Disulfidbrücken von MalS	65
Abb. 4-10.	Stabilität von MalS in einem Wildtyp- und <i>dsbA</i> -Stamm bei 28 °C und 37 °C	67
Abb. 4-11.	Löslichkeit von MalS in verschiedenen <i>dsbA</i> - und <i>degP</i> -Mutanten	71
Abb. 4-12.	Wachstumskurve und β -Galaktosidase-Aktivität der <i>degP-lacZ</i> -Fusion von den Stämmen PND2000 und CS77	75
Abb. 4-13.	Western Transfer von Extrakten aus Zellen, die ein signalsequenzloses MalS-Derivat exprimieren	78
Abb. 4-14.	Reinigung von Δ ssMalS	79
Abb. 4-15.	Status der Disulfidbrücken in MalS nach der Faltung unter reduzierenden Bedingungen	82
Abb. 4-16.	Faltung von Δ ssMalS bei unterschiedlichen Temperaturen	84
Abb. 4-17.	Disulfidbrückenausbildung in Gegenwart unterschiedlicher DsbA-Konzentrationen	85
Abb. 4-18.	Disulfidbrückenausbildung in Δ ssMalS bei unterschiedlichen pH-Werten	87
Abb. 4-19.	Überproduktion und Reinigung von DegP	88
Abb. 4-20.	Überproduktion und Reinigung von DegP _{S210A}	89
Abb. 4-21.	Disulfidbrückenausbildung bei der Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart von DegP und DegP _{S210A}	91
Abb. 4-22.	Faltung von Δ ssMalS in Anwesenheit unterschiedlicher Konzentrationen von DegP _{S210A}	92
Abb. 4-23.	Reaktivierung von chemisch denaturierter Citrat Synthase in Gegenwart von DegP und DegP _{S210A}	94

Abb. 4-24.	Rückfaltung von chemisch denaturierter β -Galaktosidase bei unterschiedlichen Temperaturen	95
Abb. 4-25.	Komplementation des hitzesensitiven Phänotyps eines <i>DegP</i> -Stammes durch <i>DegP</i> und <i>DegP</i> _{S210A}	97
Abb. 4-26.	SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins <i>DegP</i> Δ PDZ1	99
Abb. 4-27.	SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins <i>DegP</i> Δ PDZ2	100
Abb. 4-28.	SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins <i>DegP</i> Δ PDZ1,2	100
Abb. 4-29.	SDS-PAGE der Überproduktion und Reinigung des Proteins PDZ ₁₊₂	101
Abb. 4-30.	SDS-PAGE der Überexpression eines instabilen <i>degP</i> _{S210A} -Derivats ohne PDZ2-Domäne vom Plasmid pIW11	101
Abb. 4-31.	SDS-PAGE der Expression von <i>degP</i> _{S210A} -Derivaten von den Plasmiden pIW9, pIW10 und pIW12	102
Abb. 4-32.	Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart unterschiedlicher Konzentrationen der <i>DegP</i> -Derivate	105
Abb. 4-33.	Elektronenmikroskopie von <i>DegP</i> _{S210A}	108
Abb. 4-34.	Sekundärstrukturvorhersage von reifem <i>DegP</i>	109
Abb. 4-35.	Vergleich der Sekundärstruktur der PDZ1- und PDZ2-Domäne von <i>DegP</i>	110
Abb. 4-36.	Homologievergleich der PDZ1- und PDZ2-Domäne von <i>DegP</i>	110
Abb. 4-37.	Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch <i>DegP</i>	111
Abb. 4-38.	Abbau von nativem MalS durch <i>DegP</i>	112
Abb. 4-39.	Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch <i>DegP</i>	113
Abb. 4-40.	Abbau von ungefaltetem reduziertem MalS durch die <i>DegP</i> -Derivate	114
Abb. 4-41.	Abbau von nativem MalS durch die <i>DegP</i> -Derivate	115
Abb. 4-42.	Abbau von gefaltetem reduziertem MalS durch <i>DegP</i> -Derivate bei 37 °C	115
Abb. 4-43.	Bestimmung der Temperaturabhängigkeit der proteolytischen Aktivität von <i>DegP</i> durch Resorufin-markiertes Casein	117
Abb. 4-44.	SDS-PAGE von Δ ssMalS nach dem Abbau durch <i>DegP</i> bei unterschiedlichen Temperaturen	118
Abb. 4-45.	Temperaturabhängigkeit des Δ ssMalS-Abbaus durch <i>DegP</i>	118
Abb. 4-46.	Abbau von gefaltetem reduziertem MalS bei 32 °C und 42 °C durch <i>DegP</i> und die <i>DegP</i> -Derivate	119
Abb. 4-47.	Fluoreszenz-Spektrum von <i>DegP</i>	120
Abb. 5-1.	Vergleich der Aminosäuresequenz des N-Terminus von MalS und einer Domäne von GroEL	123
Abb. 5-2.	Topologisches Modell von MalS	124
Abb. 5-3.	Modell des Faltungsablaufs von MalS	133
Abb. 5-4.	Modell der Serin zugänglichkeit	138

7.2 Verzeichnis der Tabellen

Tab. 3-1.	Verwendete Bakterienstämme	19
Tab. 3-2.	Verwendete Plasmide	20
Tab. 3-3.	Verwendete Antikörper/Antiseren	21
Tab. 3-4.	Medienzusätze	23

Tab. 3-5.	pNA-Peptide zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP	42
Tab. 3-6.	Peptide zur Charakterisierung der proteolytischen Aktivität von DegP	42
Tab. 3-7.	Eichproteine für die Gelfiltration	47
Tab. 3-8.	Extinktionskoeffizienten der Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und von Cystin	48
Tab. 3-9.	Extinktionskoeffizienten der verwendeten Proteine	48
Tab. 4-1.	Abhängigkeit der MalS-Aktivität von bivalenten Kationen	55
Tab. 4-2.	Rücktitration von EDTA-behandeltem MalS mit verschiedenen zweiwertigen Kationen	56
Tab. 4-3.	MalS-Aktivität nach Reduktion der Disulfidbrücken durch DTT	59
Tab. 4-4.	Nachweis der Aggregation von reduziertem MalS durch Zentrifugation	59
Tab. 4-5.	Inhibition der MalS-Aktivität durch Acarbose	63
Tab. 4-6.	MalS-Aktivität in einer <i>dsbA</i> ⁻ -Mutante	66
Tab. 4-7.	MalS-Aktivität in einer <i>dsbC</i> ⁻ -Mutante	68
Tab. 4-8.	MalS-Aktivität in einer <i>fkpA</i> ⁻ -Mutante	68
Tab. 4-9.	MalS-Aktivität in einem <i>degP</i> ⁻ -Stamm	70
Tab. 4-10.	MalS-Aktivitäten in den Periplasmaextrakten von <i>dsbA</i> ⁻ - und <i>dsbA</i> ⁻ <i>degP</i> ⁻ -Mutanten	72
Tab. 4-11.	β -Galaktosidase-Aktivität einer transkriptionalen <i>degP-lacZ</i> -Fusion in verschiedenen Stämmen	73
Tab. 4-12.	β -Galaktosidase-Aktivität einer <i>degP-lacZ</i> -Fusion in einer <i>cpxA9</i> -Mutante	74
Tab. 4-13.	MalS-Aktivität eines signalsequenzlosen Derivats in verschiedenen Mutanten nach dem Wachstum bei 28 °C und 37°C	77
Tab. 4-14.	MalS-Aktivität nach der Faltung bei unterschiedlichem Redoxpotential	81
Tab. 4-15.	MalS-Aktivität nach der Faltung in Gegenwart von DTT	81
Tab. 4-16.	Aktivität von Δ ssMalS nach Faltung bei unterschiedlichen Temperaturen und Zeiträumen	83
Tab. 4-17.	MalS-Aktivität nach Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart von unterschiedlichen DsbA-Konzentrationen	85
Tab. 4-18.	MalS-Aktivitäten nach der Faltung von Δ ssMalS bei unterschiedlichen pH-Werten	86
Tab. 4-19.	Einfluß von DegP _{S210A} und BSA auf die MalS-Aktivität	90
Tab. 4-20.	Bestimmung der DegP-Aktivität bei unterschiedlichen Harnstoffkonzentrationen	90
Tab. 4-21.	Faltung von Δ ssMalS in Gegenwart von DegP _{S210A} unter reduzierenden Bedingungen	93
Tab. 4-22.	DegP-Derivate: Plasmide, Namen der exprimierten Proteine und Charakteristika	98
Tab. 4-23.	Oligomerer Status der DegP-Derivate	103
Tab. 4-24.	Proteolytische Aktivität der DegP-Derivate durch Spaltung von Resorufin-markiertem Casein	104
Tab. 4-25.	Komplementation des <i>degP</i> ⁻ -Phänotyps durch verschiedene DegP-Derivate	107
Tab. 5-1.	Einfluß einzelner Aminosäureaustausche in GroEL auf die Funktion	123